

ブタ卵の遠心・融合による核置換法の確立と
発生能改善に関する研究

麻布大学大学院獣医学研究科
動物応用科学専攻 動物繁殖学分野
DA0508 前泊 直樹

ブタ卵の遠心・融合による核置換法の確立と 発生能改善に関する研究

麻布大学大学院 獣医学研究科

動物応用科学専攻 動物繁殖学分野

DA0508 前泊 直樹

目次	・・・1
要旨	・・・6
略語一覧	・・・11
総合序論	・・・13
第1章 核置換のためのブタ卵の成熟、受精および胚発生に関する研究	
【序論】	・・・19
【材料と方法】	・・・21
・ 卵母細胞の採取	
・ ブタ卵の体外成熟培養	
・ 卵核胞崩壊の評価	
・ 核成熟の評価	
・ ブタ卵細胞質内グルタチオン量の測定	
・ ブタ精巢上体精子の凍結保存	
・ 成熟卵の体外受精と受精能の評価	
・ 体外受精卵の体外培養と胚発生能の評価	
・ 実験計画	
・ 統計処理	

【結果】 ……27

- ・ GVBD のタイミング
- ・ 核成熟
- ・ 卵細胞質内 GSH 量
- ・ IVF 後の受精能
- ・ IVF/IVC 後の胚盤胞への発生
- ・ 成熟卵細胞質内 GSH 量と受精能および胚盤胞への発生能の相関

【考察】 ……29

第2章 ブタ M-II 期卵の遠心・融合による核置換法の確立

【序論】 ……35

【材料と方法】 ……37

- ・ ブタ成熟卵の作出
- ・ ブタ成熟卵からの細胞質小片の作出
- ・ 電気融合による核置換卵の作出
- ・ 細胞質小片の融合状態の確認
- ・ 核置換卵の雌性前核(FPN)形成能の評価
- ・ 核置換卵の IVF および IVC
- ・ 実験計画
- ・ 統計処理

【結果】・・・41

- ・ 核置換卵の融合率と直径
- ・ 核置換卵の FPN 形成能
- ・ IVF 後の受精能
- ・ IVF/IVC 後の胚盤胞への発生能

【考察】・・・43

第3章 ブタ体外成熟卵の細胞質小片添加による胚発生能の改善に関する研究

【序論】・・・48

【材料と方法】・・・49

- ・ ブタ成熟卵の作出
- ・ 添加する細胞質小片の作出
- ・ 細胞質添加卵の作出
- ・ 細胞質添加卵の単為発生能の評価
- ・ 細胞質添加卵の IVF および IVC
- ・ 実験計画
- ・ 統計処理

【結果】・・・52

- ・ 細胞質添加卵の融合率と直径
- ・ 単為誘起処理後の胚盤胞への発生能
- ・ IVF/IVC 後の胚盤胞への発生能

【考察】	・・・54
------	-------

第4章 異種移植ブタ卵巢由来の成熟卵への応用と胚発生能改善に関する研究

【序論】	・・・57
------	-------

【材料と方法】	・・・58
---------	-------

- ・ヌードマウスへのブタ卵巢の移植
- ・Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵の作出

実験 1 : Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵を用いた核置換

- ・Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵からの Karyoplast の作出
- ・屠場卵巢由来のブタ成熟卵からの Cytoplast の作出
- ・Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵を用いた遠心・融合による核置換卵の作出
- ・Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵を用いた核置換卵の単為発生能の評価
- ・実験計画

実験 2 : Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵を用いた細胞質添加

- ・Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵を用いた細胞質添加卵の作出
- ・Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵を用いた細胞質添加卵の単為発生能の評価
- ・Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵を用いた細胞質添加卵の IVF および IVC
- ・実験計画
- ・統計処理

【結果】	・・・64
------	-------

実験 1: Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵を用いた核置換

- ・単為発生誘起処理後の胚盤胞への発生能

実験 2: Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵を用いた細胞質添加

- ・ 単為発生誘起処理後の胚盤胞への発生能
- ・ IVF/IVC 後の胚盤胞への発生能

【考察】	・・・65
総合考察	・・・68
参考文献	・・・73
図表	・・・84
謝辞	・・・107

要旨

第 1 章：核置換のためのブタ卵の成熟、受精および胚発生に関する研究

ブタは品種や系統により体外成熟卵(成熟卵)の体外受精(IVF)後の胚発生率が低い。その原因の 1 つに、成熟卵の細胞質成熟が不十分であることが考えられる。これらの卵から産子を得るには、細胞質成熟が不十分な卵から核を取り出し、あらかじめ除核した細胞質成熟が十分な卵へと導入することで卵を再構築し、IVF 後に胚を作製する方法がある。この再構築卵を得る手法を核置換と呼ぶ。核置換は除核や核の導入に顕微操作を用いるが、GV 期に核置換を行うには卵に付着している卵丘細胞を除去する必要がある。しかし、GV 期の卵丘細胞の除去がブタ卵の核成熟(成熟)、細胞質成熟の 1 つの指標である細胞質内グルタチオン(GSH)量、受精および胚発生に及ぼす影響について明らかにされていない。そこで、GV 期の卵丘細胞の除去がブタ卵の成熟、GSH 量、IVF 後の受精および胚発生に及ぼす影響を調べた。【材料と方法】屠場由来の卵巣から卵丘細胞-卵複合体(COCs)を採取し、COCs の卵丘細胞を採卵直後に除去した(DO 0 h 区)。卵丘細胞除去を行わない区を対照区(COCs 区)とし、既報[Kikuchi *et al.*, 2002]に従って体外成熟(IVM)培養を行なった。COCs 区の一部の卵を IVM 開始 24 時間後に卵丘細胞を部分的(H-DO 24 h 区)におよび完全に除去(DO 24 h 区)した。DO 24 h 区の一部は卵丘細胞と共培養した(DO 24 h + CC 区)。IVM 後に成熟率および GSH 量を測定した。各試験区の成熟卵に IVF を行い受精能および体外培養(IVC)後の胚発生能を調べた。【結果】成熟率および GSH 量は、対照区が卵丘細胞除去した全ての区より有意に高い値を示した($P < 0.05$)。IVF 後の雄性前核(MPN)形成率および胚発生率においても対照区が他の試験区と比較して有意に高い値を示した($P < 0.05$)。また、GSH 量と MPN 形成率および胚発生率の間に強い正の相関が認められた。【考察】ブタ卵の

成熟率、GSH 量、受精および胚発生には IVM 中に卵の周囲に卵丘細胞が付着していることが重要であること、GSH 量は MPN 形成、胚発生およびその細胞数に影響を及ぼすことが示唆された[Maedomari *et al.*, 2007]。

第 2 章：ブタ M-II 期卵の遠心・融合による核置換法の確立

第 1 章の結果より、ブタ卵は GV 期に核置換を行うことが困難であることが示唆された。そこで、減数分裂が静止し、卵の選別が容易で卵丘細胞を除去してもその後の胚発生に影響しない第二減数分裂中期(M-II 期)に核置換を行うことで、受精および胚発生が期待できる。しかし、核置換には顕微操作が必要であるが、その技術習得が困難であるなど問題点が多い。それらの問題点を回避するために、遠心・融合を組み合わせた Centri-Fusion 法[Fahrudin *et al.*, 2007]による M-II 期核置換卵の簡易的作製法を検討した。また、ブタの核移植卵の細胞質量の増加は、核移植胚の胚発生を改善することが知られている[Fahrudin *et al.*, 2007]。そこで、ブタ成熟卵を用いて Centri-Fusion 法により異なる細胞質量を持つ核置換卵を作出し、核置換卵の細胞質量が単為発生刺激後の雌性前核(FPN)形成、IVF 後の受精および胚発生に及ぼす影響を調べた。【材料と方法】第 1 章と同様に成熟卵を作製し、パーコールの密度勾配を利用した遠心処理により、M-II 期核を含む細胞質小片(K)および含まない細胞質小片(C)を作出した。1 つの K と 0~4 個の C を電気融合し、核置換卵を作出した(それぞれ、K, K + 1C, K + 2C, K + 3C および K + 4C 区)。透明帯を除去した卵を対照区とした。核置換卵の融合率および細胞質直径を測定後に、電気刺激による単為発生処理を行い FPN 形成能、IVF/IVC 後に受精および胚発生能を評価した。【結果】融合率は、融合させる細胞質を増やすと有意に低下し、K + 4C 区が最も低い値となった($P < 0.05$)。細胞質直径は、各試験区間に有意な差が認められ、K + 4C 区で最大となった($P < 0.05$)。K + 2C 区と対照区は同じ直径であった。各試験区の FPN 形成率には有意な差は認められなかった。また、

受精能を調べた結果、単精子受精率において K 区が他の試験区より有意に高い値を示した($P < 0.05$)。胚発生能を調べた結果、融合させる細胞質量を増やすことで、胚発生能の改善が認められた($P < 0.05$)。【考察】 Centri-Fusion 法により作出したブタ核置換卵は FPN 形成能、MPN 形成能および胚発生能を有していた。また、ブタ核置換卵の胚発生には細胞質量が重要であることが示唆された。ブタ成熟卵を用いた核置換卵由来の胚作出の報告は本研究が初めての成功例である。

第 3 章：ブタ M-II 期への細胞質小片添加による胚発生能改善に関する研究

Centri-Fusion 法によるブタ核置換卵の作出は、M-II 期核を含む K と含まない C に選別する際に、染色体を蛍光染色するために紫外線(UV)を照射する必要がある。ウシでは M-II 期核への UV 照射が、FPN 形成時に染色体の凝集などの異常を引き起こすことが知られている[Bradshaw *et al.*, 1995]。M-II 期核への UV 照射を回避することで、胚発生能の改善が期待できる。また、第 2 章においてブタ核置換卵の胚発生には細胞質量が重要であることが示唆された。そこで、UV 照射を回避し、細胞質量を増加させるために、ブタ成熟卵に C を融合させ、細胞質添加卵を作出した。細胞質添加卵の単為発生能、IVF 後の受精能および胚発生能を評価した。【材料と方法】ブタ成熟卵から第 2 章の方法に従い、M-II 期核を含まない C を作出した。その後、透明帯を除去した成熟卵(O)へ 0~3 個の C を融合させ、細胞質添加卵を作出した(それぞれ、O、O + 1C、O + 2C および O + 3C 区)。また、透明帯を除去した成熟卵を対照区とした。各試験区の卵の単為発生能、IVF/IVC 後の受精および胚発生能を評価した。【結果】細胞質添加卵の直径を測定した結果は、融合させる C を増加させることで有意に増加し、O + 3C 区で最大となった($P < 0.05$)。単為発生能は、各試験区間に有意な差は認められなかった。しかし、IVF/IVC 後の胚発生能において、細胞質添加区は対照区と比較して胚発生率は有意に増加した($P < 0.05$)。【考察】屠場卵巢由来の成熟卵に C を添

加した細胞質添加卵は、単為発生能および IVF/IVC 後の胚発生能を有していた。また、第 2 章と同様に細胞質量の増加はブタ卵の胚発生を改善する要因であることが示唆された。

第 4 章：異種移植ブタ卵巢由来の成熟卵への応用と胚発生能改善に関する研究

第 2 章および第 3 章の結果より、核置換卵および細胞質添加卵の胚発生には細胞質量が重要であることが示唆されたことから、これらの手法を異種移植(Xenograft)卵巢より採取した卵に応用した。ブタ新生子より卵巢片を回収しヌードマウスへ Xenograft し、マウス生体内にて卵胞を发育させ发育卵胞より GV 卵を得ることが可能である。この未成熟卵は IVM により成熟卵の作出が可能であるが、IVF/IVC 後の胚発生は低率である[Kaneko *et al.*, 2006]。そこで、この成熟卵から核置換卵および細胞質添加卵を作出し、単為発生能、IVF 後の受精能および胚発生能の改善を図った。【材料と方法】既報[Kaneko *et al.*, 2003]に従い Xenograft 卵巢由来の成熟卵を作出した。その成熟卵の核と、屠場卵巢由来の成熟卵の C を 2 つあるいは 3 つと融合させることで核置換卵を作出し、単為発生能を評価した。さらに、Xenograft 卵巢由来の成熟卵に、屠場卵巢由来の成熟卵の C を 3 つ融合させて細胞質添加卵を作出し、単為発生能および IVF 後の胚発生能を評価した。屠場卵巢由来の成熟卵を用いて核置換もしくは細胞質添加を行った区を対照区とした。【結果】Centri-Fusion 法により Xenograft 卵巢由来の成熟卵の核と屠場卵巢由来の成熟卵の C を融合させた核置換卵の単為発生能は対照区との間に有意な差は認められなかった。Xenograft 卵巢由来の成熟卵を用いた細胞質添加卵の単為発生能に有意な差は認められなかったが、細胞質添加卵の胚発生率は改善される傾向が認められた($P = 0.09$)。また、IVF 後の胚発生能は、各試験区間に有意な差は認められなかった。【考察】Xenograft 卵巢由来の成熟卵を用いた核置換、細胞質添加ともに胚発生能を有していた。これまで、Xenograft 卵巢由来の成熟卵の胚

発生率は 1%以下と低率であったが、核置換もしくは細胞質添加により Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵の胚発生率が改善されたことから、これらの技術は有効であることが示唆された。

以上の結果から、ブタ卵の核と細胞質の成熟、受精および胚発生には IVM 時に卵丘細胞が卵に付着していることが重要であり、GSH 量は IVM 時の卵丘細胞により制御されることが示唆された。また、ブタ成熟卵の受精および胚発生には GSH 量が重要であることが示された。また、ブタ M-II 期卵において核置換を行うことで胚発生が確認されたことから、ブタ卵の遠心・融合による M-II 期核置換は有効であることが示された。さらに、ブタの成熟卵を用いた核置換卵および細胞質添加卵は、IVF 後の胚発生能を有しており、その胚発生には細胞質量が重要であることが明らかになった。最後に、胚発生能の低い Xenograft 卵巢由来の成熟卵から胚を作出し、胚発生能を改善する手法として、細胞質添加技術が有効であることを示した。

略語一覽

ATP	Adenosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
CaCl ₂	Calcium chloride
CB	cytochalasin B
CC	Cumulus cells
CO ₂	Carbon dioxide
COC	Cumulus-oocyte complex
dbcAMP	Dibutyl cyclic AMP
DNA	Deoxyribonucleic acid
DO	Denuded oocytes
DTNB	5,5'-dithio- <i>bis</i> -2-nitro-benzonic acid
eCG	Equine chorionic gonadotrophin
EDTA-2Na	Ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt
<i>et al</i>	<i>et alia</i> (and others)
FCS	Fetal calf serum
FPN	Female pronucleus
GLM	General liner model procedure
GSH	Glutathione(Reduced form)
GV	Germinal vesicle
GVBD	Germinal vesicle breakdown
hCG	Human chorionic gonadotrophin
H-DO	Half-denuded oocytes

ICSI	Intra cytoplasmic sperm injection
IU	International unit
IVC	<i>In vitro</i> culture
IVF	<i>In vitro</i> fertilization
IVM	<i>In vitro</i> maturation
MgSO ₄	Magnesium sulfate
M-I	Metaphase-I
M-II	Metaphase-II
MPN	Male pronucleus
mtDNA	Mitochondria DNA
N ₂	Nitrogen
NADPH	β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form
NaH ₂ PO ₄	Sodium phosphate monobasic
NCSU-37	North Carolina State University-37
NSF-I	Niwa and Sasaki freezing extender-I
NSF-II	Niwa and Sasaki freezing extender-II
O ₂	Oxygen
PBS	Phosphate buffered saline
Pig-FM	Pig-fertilization medium
TCM-199	Tissue culture medium-199
WOW	the well of the well
β-ME	β-mercaptoethanol

総合序論

近年、多くの哺乳動物において、未成熟卵である卵核胞(GV)期の卵を受精可能な第二減数分裂中期(M-II 期)まで体外成熟(IVM)培養する技術や体外受精(IVF)させる技術、さらには、体外で作出した受精卵を、体外で初期胚まで培養(IVC)する技術について多くの検討が行なわれている[Kikuchi *et al.*, 1999. Kikuchi *et al.*, 2002]。ブタにおいてはIVMにより作出した体外成熟卵(受精卵)をIVFに用いた場合、IVC後の胚盤胞への発生能が著しく低い。この時、卵の核相自体はM-II 期に達し核成熟が完了していることから、胚発生能を低下させる要因の1つとして細胞質成熟が不足している可能性が示唆される[Nagai, 2001]。細胞質成熟とは、受精後あるいは活性化(単為発生)刺激付与後に卵の細胞質が胚盤胞などの初期胚へと発生を支持する卵の能力をいう。通常は、核が成熟する、すなわち、GV 期で静止していた卵の減数分裂が再開し、卵核胞崩壊(GVBD)を経て第一減数分裂中期(metaphase-I)に達した後、第一極体を放出してM-II 期へと、核成熟が振興するに従って、卵の細胞質成熟も進展する。一般には、核と細胞質の成熟は同期化するのが普通である。しかし、培養環境が不十分な場合や、卵の取り扱いに問題があると核は成熟するが胚発生が起こらないことがある。つまり、細胞質成熟が不十分であることがある。さらには、これらの人為的な手法に問題がなくとも、個体や系統および品種によっては細胞質成熟が不十分な卵しか得られないことが知られている[Marchal *et al.* 2000. Hunter 2000]。また、個体の老化により卵細胞質成熟が不十分なため不妊になることも明らかとなっている。さらに、卵巢組織の異種移植などの革新的な技術によって得られる卵においても細胞質成熟が不十分であることが報告[Kaneko *et al.*, 2006 Kikuchi *et al.*, 2006]されている。これらの卵に通常の体外胚生産技術を適用しても、胚盤胞への発生が見込めないため、高い産子の作出効率が期待できない。

もし、卵の細胞質成熟が不十分な場合や老化が起こった場合、その個体が優良形質

や希少な遺伝資源である場合、その遺伝情報を後代に維持する必要があり、その解決手法の1つとして核置換技術があげられる。核置換技術とは細胞質成熟が不十分な卵に含まれる遺伝情報(核)を細胞質成熟が十分に進行した、卵の細胞質へと置き換える技術である。クローン動物作製時に行われる核移植技術は、体細胞を除核された卵へ移植する。この技術ではドナーとして体細胞や分割途中の割球を利用するが、核置換技術はドナーとして生殖細胞の核、つまり卵の核を用いて行なうことが核移植技術と異なる点である。

現在、核置換を行う時期として、減数分裂が静止している GV 期もしくは M-II 期において行なうことが報告されている[マウス; Liu *et al.*, 2003, Moffa *et al.*, 2002、ウサギ; Li *et al.*, 2001]。哺乳動物の卵胞内の卵は GV 期において減数分裂を静止しており、多くの卵を研究に供試できるため、多くの核置換卵を作出することが可能である。さらに、GV 期に核置換を行うことで核の成熟過程における核と細胞質の相互関係を調べる手法としても有効である。一方、IVM 技術の進歩により容易に多数の体外成熟卵を作出でき、一度に多くの成熟卵を供試することが可能である。そのため、M-II 期においても同様に効率よく核置換卵を作出することが可能であると考えられる。さらに、M-II 期における核置換では胚発生過程における核と細胞質の相互関係を調べるためにも、有効な技術の1つであると考えられる。

核置換の操作を行うには顕微操作をとまなうことが一般的である。顕微操作による核置換を行う際には、始めに卵の透明帯に付着している卵丘細胞を除去し、対象とする卵は外層に存在する透明帯を露出させなければならない。卵丘細胞がその後の顕微操作において物理的な障害になるためである。この操作を裸化といい、卵丘細胞が周囲に存在しない卵を裸化卵という。さらに、GV 期において核置換を行った場合、卵丘細胞が存在しない状態で IVM を行なう必要がある。しかし、卵丘細胞がない状態での IVM による核成熟は、マウスなどの限られた動物種のみでしか報告されてい

い[マウス; Binor *et al.*, 1979. ラット; Magnusson *et al.*, 1980]。また、卵丘細胞は卵の核成熟のみならず細胞質成熟にも必要であることが報告されている[Luciano *et al.*, 2005, Nagai, 2001]。GV 期において卵細胞質と卵丘細胞は Gap Junction によって結合しており、卵丘細胞で産生された核もしくは細胞質成熟に必要な物質は、この Gap Junction を経由して卵細胞質内に蓄積される。そのため、GV 期において卵丘細胞を除去してしまうことで、核もしくは細胞質成熟に必要な物質の輸送が行なわれなくなる。ブタやウシなどの動物種では卵丘細胞を除去することで、核成熟の停止や細胞質成熟が不完全となってしまう[ブタ; Yamauchi and Nagai, 1999、ウシ; Geshi *et al.*, 2000]。このように GV 期において核置換を行えない動物種では、M-II 期核置換で対応することが望まれる。さらに、M-II 期で核置換を行い作出した M-II 置換卵は、GV 置換により作出した GV 置換卵に比べて、卵丘細胞を除去した状態で培養する時間が短いため、培養による細胞質成熟を低下させることなく IVF 後の胚の作出を効率よく行うことが出来ると期待される。すなわち、M-II 期まで卵の周囲に卵丘細胞が存在することで、IVF 後の胚盤胞への発生能が、GV 期において卵丘細胞を除去した卵よりも高い可能性が大きい。これまで、卵丘細胞の存在が卵の核成熟、細胞質成熟およびその後の受精や胚発生に及ぼす影響は明らかにされていない。そこで、本研究の第 1 章では、GV 期における卵丘細胞の除去が IVM 後の核成熟、IVF 後の受精および IVC 後の胚盤胞への発生に及ぼす影響を調べた。さらに、細胞質成熟の指標の 1 つであるとされる成熟卵細胞質内グルタチオン(GSH)量を調べ、生化学的にも卵丘細胞の存在が卵の核および細胞質成熟に与える影響を調べた。

前述したように核置換は、顕微操作により行うことが定法とされている。しかし、顕微操作の技術習得には多くの時間が必要とする。また、実験者により効率、さらに成績が大きく変わることも顕微操作の問題点の 1 つである。さらに、ブタ卵を用いた核置換では、卵の細胞質に含まれる脂肪滴により核や染色体を直接観察することが困

難である。そのため、除核の確認に DNA を特異的に染色する Hoechst などにより蛍光染色を行うことで核を可視化する必要がある。そのため、除核の確認や核注入に時間がかかるため、作出効率が悪い。これらの問題を回避する手法として、近年、ブタの成熟卵を用いた核移植の研究において、顕微操作を必要としない遠心と(電気)融合による核移植卵作出法(Centri-Fusion 法)が確立された[Fahrudin *et al.*, 2007]。この手法を核置換に応用することで1度に多くの成熟卵を処理することが可能となり、効率よく多くのブタ核置換卵を作出することが可能となる。さらに、ウシでは除核した卵に細胞質を融合させ、細胞質量を増加した卵は核移植後の胚盤胞への発生およびその細胞数が向上することが報告されている[Peura *et al.*, 1998, Tecirlioglu *et al.*, 2005]。また、ブタにおいても細胞質量の増加が胚盤胞への発生およびその細胞数を向上させることが報告されている[Fahrudin *et al.*, 2007]。そこで、第2章ではブタ成熟卵を用いて、遠心・融合による核置換卵の作出を行うと同時に、融合させる細胞質の数を変えることで、核置換卵の細胞質量を増加させることで、核置換卵の細胞質量が、IVF 後の受精能および胚盤胞への発生に及ぼす影響を検討した。

Centri-Fusion 法を応用した核置換卵作製では、パーコールの密度勾配を利用した遠心処理によりブタ成熟卵を断片化した後、蛍光色素を用いて DNA を染色し、紫外線 (UV) 下で M-II 期核を観察することにより、M-II 期核を含む細胞質小片と含まない細胞質小片(Cytoplast)を選別し、M-II 期核を含む小片をドナーとして使用する。しかし、M-II 期核への UV 照射は M-II 期核のその後の発生過程において、MPN 形成の不全などの影響があることが報告されている[Bradshaw *et al.*, 1995]。そのため、M-II 期の核への UV 照射の回避により、胚発生能を改善させることが期待できる。そこで、成熟卵をパーコールの密度勾配を利用した遠心処理後に得られた、Cytoplast を成熟卵に添加することを考えた。この手法では Cytoplast を添加する成熟卵(対象卵)には UV 照射を行わないこと、さらに添加する Cytoplast には胚盤胞への発生に必要であると考

えられる GSH や細胞内小器官が含まれると考えられるため、対象卵の細胞質成熟をさらに促進し、胚盤胞の発生を改善することが期待できる。そこで、本研究の 3 章ではブタ成熟卵へ Cytoplast を追加・融合させることで細胞質添加卵を作出し、添加した Cytoplast がブタ成熟卵の IVF 後の胚盤胞への発生能に及ぼす影響を検討した。

さらに、ブタ新生子より回収した卵巢をヌードマウスの腎皮膜下へ異種移植 (Xenograft) することで、マウス生体内で卵巢に含まれる卵胞を原始卵胞から胞状卵胞へ発育させうることが報告されている [Kaneko *et al.*, 2003]。この Xenograft 卵巢の胞状卵胞から GV 期の卵を回収することができる。そして、得られた GV 期卵は IVM を行なうことで M-II 期まで成熟させることが可能である。しかし、IVF を行っても、胚盤胞への発生率は極めて低い。Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵の胚盤胞への発生能が低い原因の 1 つとして、この卵は細胞質成熟が不十分であることが報告されている [Kikuchi *et al.*, 2006]。本研究において検討してきた核置換技術や細胞質添加技術を Xenograft 卵巢由来の成熟卵へ適応することができれば、新たなブタ遺伝資源の保存法として期待される。そこで、第 4 章では Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵の核を屠場卵巢由来のブタ成熟卵の細胞質へ核置換を行った。さらに屠場卵巢由来のブタ成熟卵より作出した Cytoplast を Xenograft 卵巢由来ブタ成熟卵へ追加・融合し、細胞質添加卵を作出することで、Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵の IVF 後の胚盤胞への発生の改善を検討した。

第1章

核置換のためのブタ卵の成熟、受精および胚発生に関する研究

【序論】

現在、動物個体の加齢と共に卵自体も老化し、成熟・胚発生能を失うことがある。このように成熟・胚発生能を失った細胞質を持つ卵の核に含まれる遺伝情報を維持するためには、成熟・胚発生能を有している卵細胞質へ核を移し変える技術が利用されており、これは核置換と呼ばれる。核置換を行う卵のステージとして減数分裂が静止している、GV 期もしくは M-II 期が考えられる。これまで、マウスやウサギなどの実験動物において、GV 期における核置換(以下、GV 置換)により作出した再構築卵から産子の作出が報告されている[Li *et al.*, 2001, Hui *et al.*, 2003]。現在も、M-II 核置換よりも GV 置換の研究が多く行われていると考えられる。その理由の 1 つとして、未成熟卵と成熟卵の細胞骨格の違いが上げられる[Wu *et al.*, 1999]。GV 期の卵は成熟卵に比べて微小管などの細胞骨格が完全に完成されていないことで、細胞質から核を抜き取るすなわち除核する際の顕微操作をスムーズに行うことができるため、除核時の細胞質へのダメージが少ないことが考えられる。GV 置換において、核の除核や注入などの操作を顕微鏡下で行うことが、GV 置換の一般的な手法である。しかし、顕微操作を行う際に卵丘細胞が卵の核の可視化、顕微操作において卵を保持する際に大きな障害となり、操作を行う前に卵から卵丘細胞を完全に、または部分的に除去する必要がある。

GV 置換に関して、卵の周囲に存在している卵丘細胞に関しても注目する必要がある。哺乳動物の未成熟卵の卵丘細胞は IVM 中に核および細胞質成熟を促進することが報告されている[Mattioli *et al.*, 1998, Tatemoto *et al.*, 2000, Somfai *et al.*, 2004]。細胞質成熟とは、成熟卵の IVF/IVC 後の胚盤胞への発生を支持する能力である[Nagai, 2001]。これまで、細胞質成熟の測定可能な指標として卵細胞質内グルタチオン(GSH)量が提唱されている[Eppig *et al.*, 1996, de Matos *et al.*, 2000]。GSH は体細胞だけではなく哺乳動物の配偶子においても、その強い還元作用により酸化ストレスによって引き起こさ

れるアポトーシスから保護してくれる重要な役割を有していることが報告されている[Meister. 1983, Luberda *et al.*, 2005]。また、卵細胞質内の GSH は卵に侵入した精子頭部が脱凝縮して雄性前核(MPN)を形成し、受精が完了する際に不可欠なものである[Yoshida *et al.*, 1993]。Yamauchi and Nagai(1999)はブタ未成熟卵の卵丘細胞の除去は卵細胞質内 GSH 量、精子侵入率および MPN 形成率の低下を引き起こすことを報告した[Yamauchi and Nagai.]. さらに、卵細胞質内 GSH 量の増加が成熟卵の IVF/IVC 後の胚盤胞への発生率に及ぼす影響については、現在、2 つの報告がなされている[Nagai *et al.*, 2000, Tatemoto *et al.*, 2001]。Nagai *et al* は IVM 培地にシステアミンを添加することで、また、Tatemoto *et al.*(2001)は IVM 培地にアスコルビン酸を添加することで、ブタ卵の卵細胞質内 GSH 量が上昇し IVF/IVC 後の胚発生が改善することを報告した。しかし、胚盤胞への発生率は依然低く、卵細胞質内 GSH 量と成熟卵の IVF/IVC 後の胚発生の関係に関する報告はない。卵の周囲の卵丘細胞は Gap junction を介して構造的に、あるいは代謝的に卵と結合しており、GSH 合成と卵細胞質内への GSH の蓄積を制御していると種々の動物種で報告されている[ブタ, Yamauchi and Nagai. 1999, Mori *et al.*, 2000, Nagai, 2001; ウシ, de Matos *et al.*, 1995, de Matos *et al.*, 1997]。これらの報告より、卵丘細胞は Gap junction を介して卵細胞質内 GSH 量の制御に重要な役割を果たしていると考えられている。卵と卵丘細胞間の Gap junction は成熟が進行するにしたがって徐々に解離する[Motlik *et al.*, 1986, Isobe *et al.*, 1998]。つまり、卵丘細胞の状態と Gap junction の結合状態は、IVM 後の成熟卵の細胞質成熟に影響すると考えられるが、現在、卵丘細胞の細胞質成熟に及ぼす影響に関しては詳細かつ正確な報告はない。

そこで第 1 章では、未成熟卵から卵丘細胞を除去しブタの卵丘細胞が制御すると考えられる、細胞質成熟の指標の 1 つである成熟卵細胞質内 GSH 量と IVM/IVF/IVC 後の核成熟、受精能および胚発生における精密な関係を調べた。

【材料と方法】

本実験は麻布大学動物実験委員会の許可を得て行った。

<卵母細胞の採取>

ブタ卵丘細胞-卵母細胞複合体(cumulus-oocyte complexes; COCs)の採取はKikuchi *et al.*(2002)に従って行った。ブタ卵巢は、屠場において春季発動前の未経産ブタ(Landrace × Large White × Duroc)から採取し、ダルベッコ PBS(日水製薬、Tokyo, Japan)にて洗浄後、35℃に保温したまま研究室まで輸送した。卵巢の表面に存在する発育した直径2～6 mmの卵胞をメスで細切することで卵胞からCOCsを卵胞液と共に取り出し、15 ml チューブ(BD Falcon BD bioscience, U.S.A.)に回収した。その後、このチューブを38℃に加温したヒートブロックに約5分間立てた状態で静置することで、COCsをチューブの底に沈殿させた。卵胞液の上清を除去し、沈殿部を5%(v/v)ウシ胎仔血清 (FCS; Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA), 20 mM HEPES(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan), 100 international unit(以下、IU)/ml ペニシリンGカリウム塩(Sigma, Chemical Co., St Louis, MO, USA)、0.1 mg/ml ストレプトマイシン硫酸塩(Sigma)を添加したTCM-199(with Hanks salts; Gibco)中に滴下し、実体顕微鏡下で卵丘細胞が密に付着したCOCsを採取した(Fig. 1A)。また、採取した直後にCOCsを、最終濃度が150 IU/mlになるようにTCM-199で調整したヒアルロニダーゼ(Sigma)に約30秒間感作させた後に、ヒアルロニダーゼを含まないTCM-199中にてピペッティングを行い、卵丘細胞を除去(裸化)し裸化卵を作出した。採卵直後に裸化した区をdenuded oocytes(DOs; Fig. 1B) 0 h 区とした。DOs 0 h 区および卵丘細胞は、後の実験に使用するためにCOCsと同様な条件にて体外成熟(IVM)培養を行った。

<ブタ卵の体外成熟培養>

IVM は、Kikuchi *et al.*(2002)の報告に従って行った。約 40 個の COCs および DOs を 10%(v/v)卵胞液、0.6 mM cysteine(Sigma)、50 μ M β -mercaptoethanol(β -ME; Sigma)、1 mM dibutyryl-cAMP dbcAMP; Sigma)、10 IU/ml eCG(PMSG 1000 IU; Nihon Zenyaku Kogyo, Koriyama, Japan)、10 IU/ml hCG(Puberogen 500 IU; Sankyo, Tokyo, Japan)を添加した、修正 North Carolina State University-37[Petters and Wells 1993](以下、mNCSU-37 1st)500 μ l 中に入れ、24 時間培養を行った。24 時間後に COCs(Fig. 1C)の一部は既報に従って卵丘細胞を完全に裸化した(DOs 24 h; Fig. 1D)。COCs、DOs 0h および DOs 24h はさらに dbcAMP とホルモン(eCG および hCG)を含まない mNCSU-37(以下、mNCSU-37 2nd)にて培養を行い、総培養時間が 44 時間になるまで IVM を行った。培養には 4 穴シャーレ(Nunc Multidishes; Nalge Nunc International, Denmark)を使用し、38.5°C、5%O₂(O₂、CO₂ および N₂ 濃度をそれぞれ、5%、5%および 90%に調整)、湿度飽和の条件下で行った。

<卵核胞崩壊の評価>

卵核胞崩壊(GVBD)の正確な時間を調べるため、COCsはmNCSU-37 1stにて24時間培養を行い、さらにmNCSU-37 2nd にてさらに0、3、6および9時間培養を行った(それぞれ、総培養時間は24、27、30および33h)。卵丘細胞の付着しているブタ卵は前述通りに卵丘細胞を除去した。ホルマウント標本作製し、カルノア固定液(酢酸：エタノール = 1：3)内で約1週間かけて、卵の固定・脱脂を行った。その後、1%アセトオルセイン(Sigma)染色液で約5分間染色後、アセトグリセロールで封入した。封入後に位相差顕微鏡下で卵の核相を観察した。

<核成熟の評価>

44 時間成熟培養後、各試験区の卵の一部を固定/染色を行い、第一極体を放出し凝縮した染色体が赤道面に並んでいる卵を第二減数分裂中期卵(成熟卵)とした。成熟卵の割合を成熟率として、各試験区の成熟率を調べて成熟能の評価を行った。

<ブタ卵細胞質内グルタチオン量の測定>

ブタ未成熟卵のサンプリングは、採卵直後、IVM 開始 24 時間後、成熟卵のサンプリングは IVM 開始 44 時間後に行った。卵のサンプリングを行う際、卵丘細胞が付着した未成熟卵はヒアルロニダーゼ処理およびピペッティングにより卵丘細胞を除去し、卵細胞質が形態的に正常なものを 1 サンプルあたり 20 個ずつ採取した。また成熟卵のサンプリングは、卵丘細胞を除去後に実体顕微鏡下で第一極体を放出した卵を成熟卵として、1 サンプルあたり 20 個ずつ採取した。採卵直後に卵丘細胞を除去後に IVM を行った、DOs 0 h 区についても同様に、IVM 開始 24 時間後に形態的に正常な卵を 1 サンプルあたり 20 個ずつ採取した。さらに、各試験区より得られた成熟卵も同様にサンプリングを行った。採取したサンプルを、0.2 M NaH_2PO_4 (和光純薬、Osaka, Japan)、0.2 M Na_2HPO_4 (和光純薬、Osaka, Japan)、10 mM EDTA-2Na(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)を蒸留水で調整した 0.2 M リン酸緩衝液(pH 7.2: 以下リン酸緩衝液)で洗浄後、5 μl のリン酸緩衝液とともに、エッペンドルフチューブに移し、さらに蒸留水で 1.25 M に調整したリン酸溶液(和光純薬、Osaka, Japan)を 5 μl 添加し、攪拌した後に測定を行うまで -80°C にて保存した。サンプルの細胞質内 GSH 量は、Anderson の方法 [Anderson, 1985] を修正した 5,5'-dithio-bis-2-nitro-benzonic acid (DTNB)-glutathione disulfide reductase recycling 法により測定した [Ozawa *et al.*, 2002]。0.33 mg の β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form(以下、NADPH、和光純薬、Osaka, Japan)を 1 ml のリン酸緩衝液で融解した NADPH 溶液 175 μl 、リン酸

緩衝液により濃度が 0.75 M になるように調整した 25 μ l の DTNB(和光純薬、Osaka, Japan)、40 μ l の蒸留水をサンプルに添加後に攪拌し、15 分間室温下にて静置した。その後 125 IU/ml の glutathione reductase(和光純薬、Osaka, Japan)を 5 μ l 添加した直後に分光光度計を使用し、412 nm における吸光度を 30 秒間隔で 3 分間測定した。またサンプルを測定する前に、0~250 pmol の濃度の GSH(和光純薬、Osaka, Japan)を測定して、スタンダード直線を作成し(R^2 の値が 0.995 以上)、各サンプルにおいて吸光度の時間当たりの変化から、細胞質の GSH 濃度を算出した。

<ブタ精巣上体精子の凍結保存>

精巣上体精子を既報により採取し凍結した[Kikuchi *et al.*, 1998]。簡潔に記述すると、屠場で雄ブタ(ランドレース種)の精巣上体を採集し、室温にて研究室に輸送した。精巣上体尾部を精巣より分離し、シリンジを用いて輸卵管内に空気を送り込むことで、精巣上体精子(以下、精子)を採取した。採取した精子を 30 ml の前処理液[330 mM glucose、12.8 mM trisodium citrate dihydrate、14.3 mM sodium hydrogen carbonate、9.9 mM EDTA-2Na、抗生物質(1,000 IU/ml penicillin G potassium(Sigma)および 1 mg/ml streptomycin sulfate(Sigma))]で希釈した。精子懸濁液を 15°C に冷却後に 1,200 $\times g$ で 10 分間の遠心処理を行った。上清を除去し、15°C に冷却した 5 ml の NSF-I 希釈液[80%(v/v)310 mM lactose、20%(v/v)卵黄および抗生物質]で再懸濁させ、約 2 時間かけて 4°C まで冷却した。4°C に冷却後、等量の NSF-II[92.5%(v/v)NSF-I、1.5%(v/v)Equex Stem(Noba Chemical Sales Inc., Scituate, MA, USA)、6%(v/v)グリセリンおよび抗生物質]を添加した。精子懸濁液を 0.25 ml ストロー(IMV, L'aigle, Cedex, France)に封入し、液体窒素蒸気中に 10 分間予備凍結を行った後、液体窒素中に投入し保存した。

<成熟卵の体外受精と受精能の評価>

IVM終了後、卵に付着した卵丘細胞を既報により除去し、実体顕微鏡下で卵腔内に第1極体を放出した卵を成熟卵として、凍結融解精子とIVFを行った。IVFはKikuchi *et al.*(2002)の報告に従って行った。凍結精子を38℃の温水中で融解し、融解した凍結精子をpH を7.8に調整したTCM-199(TCM-199 for sperm)[Nagai *et al.*, 1988]に浮遊させた。その後、600 × gで2分間遠心処理により精子を洗浄し、成熟卵と共培養を行うまで37℃のインキュベーター内で前培養を行った。体外受精培地として、8 mM CaCl₂(Sigma)、2 mM sodium pyruvate(Sigma)、2mM caffeine(Sigma)、5 mg/ml BSA(fraction V; Sigma)を添加したPig-FM[Suzuki *et al.*, 2002]を使用した。約20個の卵を含むPig-FM(90 μl)中に前培養処理を行った凍結融解精子(10 μl)を、最終精子濃度が 1.0×10^5 /mlになるように添加した。その後、インキュベーター(39℃, 5%O₂, 湿度飽和)内にて共培養を行った。共培養開始3時間後にIVF卵をPig-FMから4 mg/ml BSA、50 mM β-ME、0.17 mM sodium pyruvate(Sigma)、2.73 mM sodium lactate(関東化学、Tokyo, Japan)を含むmNCSU-37(IVC-PyrLac)に移した後、IVF卵の透明帯に付着した精子をピペッティングにより除去し、IVC-PyrLacで3回洗浄後、IVF卵を4穴シャーレに移しインキュベーター内でIVCを行った。IVCは、38.5℃、5%O₂の条件下で行った。精子と成熟卵の共培養開始10時間後、IVF卵の一部をホルマウントし、既報に従って固定/染色した。その後、位相差顕微鏡下で卵細胞質内精子進入率、MPN形成率、単精子受精率を算出し受精能の評価を行った。

<体外受精卵の体外培養と胚発生能の評価>

IVC は Kikuchi *et al.*(2002)の報告に従って行った。IVF を行った日を Day 0 とし、Day 0 から Day 2 までは IVC-PyrLac にて、Day 2 から Day 6 は IVC-PyrLac から 4 mg/ml BSA 、 50 mM β-ME 、 5.55 mM Glucose(和光純薬, Osaka, Japan)を含む

mNCSU-37(IVC-Glu)培地にて胚の培養を行った。IVC 開始 6 日後に、胚のホルマリン標本を作製し、既報に従って固定/染色した。その後、位相差顕微鏡下で胚を観察し、胚盤腔を形成した胚を胚盤胞として、胚盤胞への発生率およびその胚盤胞細胞数を求め、胚の発生能の評価を行った。

<実験計画>

本研究において、卵丘細胞が未成熟卵の成熟、成熟卵細胞質内 GSH 量、受精および胚発生に及ぼす影響を調べるために以下の試験区(Fig. 1 参照)を設定した。

対照区	COCs を mNCSU-37 1 st で 24 時間培養後、mNCSU-37 2 nd にて 20 時間 IVM を行った区(Fig. 1A)。
-----	--

DO 0h 区	採卵直後に COCs から卵丘細胞を完全に除去し、対照区と同様に総培養時間が 44 時間になるように培養を行った区(Fig. 1B)。
---------	---

DO 24h 区	COCs を mNCSU-37 1 st で 24 時間培養後、卵丘細胞を完全に除去し、さらに mNCSU-37 2 nd にて 20 時間 IVM を行った区(Fig. 1D)。
----------	--

DO 24h + CC 区	DO 24h 区の一部を COCs 採取時に COCs から除去した卵丘細胞と mNCSU-37 2 nd にて 20 時間共培養を行った区(Fig. 1E)。
---------------	---

H-DO 24h 区	COCs を mNCSU-37 1 st で 24 時間培養後、卵丘細胞を部分的に除去し、さらに mNCSU-37 2 nd にて 20 時間 IVM を行った区(Fig. 1F)。
------------	---

<統計処理>

ブタ卵の IVM 後の成熟率、成熟卵を用いた IVF 後の精子侵入率、単精子受精率および MPN 形成率、さらに IVC 後の胚盤胞への発生率はすべてアークサイン変換を行った[Snedecor *et al.*, 1989]。その後、胚盤胞細胞数を含む全てのデータは Statistical Analysis System(SAS; SAS Institute, Cary, NC, USA)の The General Liner Model procedure(GLM)を使用し、一元配置の分散分析を行い、解析モデルに有意差が認められた場合、引き続きダンカンの多重比較検定を行った。また、成熟卵細胞質内 GSH 量と IVF 後の MPN 形成率、成熟卵細胞質内 GSH 量と IVM/IVF 卵の IVC 後の胚盤胞への発生率との相関を SAS の回帰分析を使用し、それぞれ相関を求めた。

【結果】

<GVBD のタイミング>

卵丘細胞が付着した卵の成熟培養開始 24～33 時間後の減数分裂の進行を Fig. 2 に示した。培養開始 24 時間後では退行卵を除き、全ての卵は GV 期であった(97.3%)。染色体の凝集と proM-I(GV から典型的な M-I までの移行期、すなわち GVBD の様相を示す)は培養開始 27 時間後から観察され(10.9%)、培養開始 30 時間後にはその割合は増加した(34.5%; $P < 0.05$)。M-I および telophase-I 期の卵は培養開始 27 時間後から観察され始め(3.1%)、培養開始 33 時間後までに、その割合は増加した(56.3%)。また、培養開始 33 時間後に成熟卵が観察された(0.7%)。

<核成熟>

卵丘細胞を除去した卵の IVM 後の成熟率を Table 1 に示した。IVM を行った結果、対照区の成熟率($P < 0.05$; 64.5 %)は、採卵直後に卵丘細胞の除去もしくは、IVM 開始

24 時間後に卵丘細胞の除去を行った区と比較して有意に高い値を示した(DO 0 h 区、DO 24 h 区、DO 24 h + CC 区、H-DO 24 h 区; 34.3~41.7 %)。しかし、卵丘細胞除去処理を行った試験区(DO 0 h 区、DO 24 h 区、H-DO 24 h 区、DO 24 h + CC 区)間では有意な差は認められなかった。

<卵細胞質内 GSH 量>

IVM 開始 44 時間後において対照区における成熟卵細胞質内 GSH 量(9.60 pmol/oocyte)は IVM 開始前および 24 時間後の GSH 量と比較して有意に高い値を示した(7.48 および 8.03 pmol/oocyte; $P < 0.05$; Table 2)。さらに、対照区の成熟卵細胞質内 GSH 量は卵丘細胞を除去した各試験区(DO 0h 区、DO 24h 区、DO 24h + CC 区および H-DO 24h 区: 4.03~7.00 pmol/oocyte; $P < 0.05$)に比べて有意に高い値を示した。また、H-DO 24h 区は卵丘細胞を完全に除去した DO 0h 区、DO 24h 区および DO 24h + CC 区と比較して有意に高い値を示した($P < 0.05$)。卵丘細胞を完全に除去した各試験区間には有意な差は認められなかった。

<IVF 後の受精能>

IVF 後の精子侵入率、単精子受精率および MPN 形成率は Table 3 に示した。成熟卵の精子侵入率は IVM 時の卵丘細胞の状態に関係なく、対照区(90.4%)および各試験区間(85.3~97.8%)には有意な差は認められなかった。さらに卵丘細胞を除去した各試験区の単精子受精率(7.4~19.0%)も同様に対照区(30.5%)と比較して有意な差は認められなかった。しかし、IVF 後の MPN 形成率において対照区(89.4%)は、DO 0h 区(41.4%)、DO 24h 区(59.3%)および DO 24h + CC 区(50.6%)より有意に高い値を示した($P < 0.05$)。H-DO 24 区の MPN 形成率(80.0%)は対照区と比較して有意な差は認められなかった。

<IVF/IVC 後の胚盤胞への発生>

各試験区より得られた成熟卵の IVF/IVC 後の胚盤胞への発生率を調べた結果、対照区(19.9%)は DO 0h 区(3.0%)、DO 24h 区(4.3%)および DO 24h + CC 区(4.5%)に比べて有意に高い値を示した($P < 0.05$; Table 4)。しかし、H-DO 24h 区の胚盤胞への発生率(11.6%)は対照区と比較して有意な差は認められなかった。また、胚盤胞の平均細胞数を調べた結果、全ての試験区間に有意な差は認められなかった。

<成熟卵細胞質内 GSH 量と受精能および胚盤胞への発生能との相関>

成熟卵細胞質内 GSH 量は IVF 後の MPN 形成率と強い正の相関が認められた($P < 0.01$; $r = 0.948$; Fig. 3)。同様に、成熟卵細胞質内 GSH 量と胚盤胞への発生率($P < 0.01$, $r = 0.990$)および胚盤胞の平均細胞数($P < 0.05$; $r = 0.885$)との間にも、強い正の相関が認められた。しかし、成熟卵細胞質内 GSH 量とその他の受精の指標(精子侵入率、単精子受精率)との間には相関は認められなかった。

【考察】

これまでに、哺乳動物の IVM 卵の GSH 量の増加は、受精中の精子頭部の脱凝縮と MPN 形成を促進すると報告されている[Calvin *et al.*, 1986, Perreault *et al.*, 1988, Yoshida *et al.*, 1993a, Yoshida *et al.*, 1993b, Funahashi *et al.*, 1995]。本研究の結果からも、ブタ卵細胞質内 GSH 量と MPN 形成において明らかな相関が認められた(Fig. 3)。さらに、IVM 培地中へのシステインやシステアミンの添加が卵細胞質内 GSH 量および胚発生率、もしくは凍結融解後の生存率を向上させる有効な効果があることが報告されている[ブタ; Abeydeera *et al.*, 1999、ウシ; de Matos *et al.*, 1995, 1997]。しかし、これまで IVM 中の卵丘細胞の有無、卵丘細胞の数あるいは存在様式、例えば直接卵に付着するか細

胞と共培養するかという条件、を変えて IVM 成熟卵の細胞質 GSH 量と IVF 後の受精卵の胚発生の指標との相関関係を調べた報告はなかった。本研究の結果は IVM 成熟卵の細胞質内 GSH 量が IVM 中の卵丘細胞が卵と付着していることが重要であること、また GSH 量が IVM/IVF/IVC 後の胚発生能(胚盤胞への発生率および胚盤胞細胞数; それぞれ Fig. 3 D E)と相関関係があることを証明した初めての報告となった。

マウス[Binor *et al.*, 1979]とラット[Magnusson *et al.*, 1980]の卵では、IVM 時に卵丘細胞が存在しなくても、卵の成熟率は卵丘細胞が存在する時と有意な差は認められないと報告されている。マウスにおいては卵丘細胞を除去後に、IVM を行うことで作出した成熟卵は卵丘細胞がついた状態で垂 IVM を行った場合と同様の受精能を有し、さらには胚盤胞まで発生する能力を有していると報告されている[Nishi *et al.*, 2003]。また、ウシでは卵丘細胞を除去した未成熟卵を IVM した結果には、様々な報告がなされている。Zhang *et al.*(1995)は、卵丘細胞を除去したウシ未成熟卵の成熟率が低下するため IVM 中には卵丘細胞は必要であると報告した。しかし、Kim *et al.*(1997)は IVM 時の核成熟においては、IVM 中に卵丘細胞は必要ないと報告した。しかし、ブタでは卵丘細胞を除去した未成熟卵の成熟率は、COCs と比較して低いことが報告されている[Bing *et al.*, 2002]。さらに、IVM 中に卵丘細胞を除去し、得られたブタ成熟卵を IVF すると、MPN 形成も抑制されると報告されている[Yamauchi and Nagai, 1999]。IVM 中に卵丘細胞を除去したブタ卵のほとんどは、IVF 後に 2 細胞もしくは 4 細胞期胚で発生を停止し[Nagai *et al.*, 1998]、限られた数の胚のみ(3.2%)しか胚盤胞まで発生しない[Tatemoto *et al.*, 2001]。卵丘細胞が IVM 中に存在した場合、IVF 後の MPN 形成やその後の胚発生に影響を及ぼすという本研究の結果は、これまで報告されてきた研究と同様の結果となった。以上より、本研究とこれまでの研究報告から、哺乳動物において IVM 中の卵の成熟・受精および胚発生における卵丘細胞の影響には種差があるということが示唆される。しかし、卵丘細胞の影響に種差がある理由は未だ明らかになって

いない。

ブタでは卵丘細胞は IVM 中に卵をストレスから保護し、結果として核と細胞質成熟を促進していると考えられる[Mattioli *et al.*, 1988, Tatemoto *et al.*, 2000, Somfai *et al.*, 2004]。その 1 つの要因として卵細胞質内 GSH 量の存在とその量が重要であると示唆されている[ブタ; Tatemoto *et al.*, 2000, Yamauchi and Nagai, 1999, ウシ; Fatehi *et al.*, 2005]。ブタでは、酸化ストレスに対する卵丘細胞除去の効果を調べる研究が行なわれており、卵丘細胞は卵細胞質内 GSH 量を増加させることで、アポトーシスを引き起こすとされる酸化ストレスから卵を保護していると考えられている[Tatemoto *et al.*, 2000, Yamauchi and Nagai, 1999]。GSH は、広く哺乳動物の細胞内に存在する主要なペプチド性のチオールであり、酸化ストレスから細胞を保護する還元物質として重要な役割を有している[Meister, 1983]。卵細胞質内にシステインが取り込まれることにより卵が GSH 合成を直接行なうことが可能であるが[Yamauchi and Nagai, 1999]、卵丘細胞はシステインだけでなくシスチンが、グリシンとグルタミン酸と結合することで GSH 合成に重要な役割を有している[Nagai, 2001]。この GSH 産生の機構は培地中へシステインもしくは、システアミンを添加することで促進させることが知られている[Yamauchi and Nagai, 1999; Nagai, 2001; Yoshida *et al.*, 1993a, 1993b]。ブタでは GSH 産生は卵丘細胞によって行なわれていると報告されており、卵丘細胞で産生された GSH が Gap junction を介して卵細胞質内に運ばれ、蓄積されると報告されている[Mori *et al.*, 2000, Nagai, 2001]。本研究において、卵からの卵丘細胞の除去時間を変える(DO 0 h 区もしくは DO 24 h 区)ことで、その後の成熟卵細胞質内 GSH 量は対照区および卵丘細胞を部分的に除去した H-DO 24 h 区と比べて低くなり、これまでの報告と同様の結果が得られた。一方、卵丘細胞を完全に除去し卵丘細胞と共培養を行なった区において、卵細胞質内 GSH 量が DO 24 h 区と差がなく、量が増えることはなかった。このことは、COCs においては 24 時間培養したときに存在していた Gap junction を介して

卵丘細胞から GSH が卵細胞質に蓄積されたためと考えられる[Motlik *et al.*, 1986, Isobe *et al.*, 1998]。本研究において卵丘細胞と卵丘細胞除去ブタ卵との共培養は細胞質内 GSH 量を十分に促進しなかったが、ウシにおいて卵丘細胞と共培養を行なった卵丘細胞除去卵においては、卵細胞質内 GSH の蓄積が促されると報告されている[de Matos *et al.*, 1997]。卵の成熟培養中に卵丘細胞との共培養の GSH 蓄積におよぼす影響についても種差があると考えられる。

また、卵丘細胞を除去して培養を行うことで卵細胞質内 GSH 量が、IVM 開始前と比べて有意に低下した。この結果は、卵丘細胞除去卵が酸化ストレスから卵を保護するために細胞質内 GSH を利用したためと考えられる。卵丘細胞除去卵では、卵丘細胞を除去しているため GSH は卵丘細胞から供給されない。しかし、卵細胞自身も培地中のシステインから新たに GSH を合成し、卵細胞質内へと蓄積することが考えられる。Yamauchi and Nagai(1998)は、システインが大量に含まれた TCM-199 中にシステアミンを添加した培地中で、卵丘細胞除去卵の IVM を行なうことで、大量の GSH が直接、卵細胞質内で合成されていることを明らかにした。これらの結果と本研究における結果の矛盾については、ブタ卵の IVM に使用する培地もしくは使用した添加物などが異なるために、細胞質中で GSH を合成する能力に違いが出たためと考えられる。卵自体の GSH 合成機構においては今後、詳細な研究を実施する必要がある。

一方、Gap junction に加えて、卵丘細胞の細胞外マトリックスとしてグリコサミノグリカンが形成され、IVM 卵の細胞質内 GSH 量を維持する役割を有しているのではないかと考えられる[Yokoo *et al.*, 2004]。グリコサミノグリカンとは、硫酸基が付加した 2 糖の繰り返し構造からなる、長鎖の通常枝分れがみられない多糖である。グリコサミノグリカンには、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸などであり、*in vivo* や *in vitro* の環境化において、動物の結合組織を中心にあらゆる組織に普遍的に存在し、体細胞などの周囲に存在すると報告されている[Campo *et al.*, 2004a, 2004b]。このように

卵丘細胞の細胞外マトリックスが成熟卵細胞質内 GSH 量を維持する可能性がある。しかし、培地に卵丘細胞を直接添加(DO 24 + CC 区)しても MPN 形成能や胚盤胞への発生能は改善されなかった。これまで、ヒツジの卵において Staigmiller and Moor(1984) は IVM 時に卵細胞を培地に添加しても IVF 後の胚盤胞への発生には影響しないことを報告している。そのため、IVM 時には、卵周囲の細胞外マトリックスが培地中に存在しているだけではなく、卵周囲に三次元配置構造にて存在することが、酸化物質からのダメージなどの軽減に重要であることが考えられる。

本研究において COCs から IVM 開始 0 もしくは 24 時間後に卵丘細胞を除去することで、IVM 後に成熟率が低下する現象が顕著に現れた。また、MPN 形成と胚盤胞への発生においても同様の結果が得られた。ブタやウシにおいて、卵丘細胞を除去した時の受精および胚発生において同様の効果が報告されている[ブタ; Wongarikeao *et al.*, 2005, ウシ; Magnusson. 1980, Nishi *et al.*, 2003]。さらに、卵丘細胞を除去することで、細胞質内 GSH 量にも重大な影響を及ぼすことが明らかとなった。

本研究において、GVBD が起こる前後に卵丘細胞が卵に付着していることは MPN 形成および胚盤胞への発生に重要であることが示唆された。また、それらの能力は卵丘細胞で合成され成熟卵細胞質内に蓄積された GSH 量で調整されていることが示唆された。しかし、低率ではあるが体外での胚生産の可能性が示唆されたことから、豚において GV 期に核置換を行うためにはさらなる体外胚生産の手法、特に核および細胞質成熟の向上を念頭においた技術の改良が求められる。

この知見をもとに、第 2 章では、卵の胚の発生に卵丘細胞の影響を受けず、IVF 後の IVC 技術が確立されている、M-II 期において核置換を実施することにした。

第 2 章

ブタ M-II 期卵の遠心・融合による核置換法の確立

【序論】

哺乳動物の卵を用いた核置換は、不妊や動物個体の加齢と共に卵が老化することにより成熟能を失った卵の遺伝情報を維持する手法として有効であり、さらに、核と細胞質の相互関係を調べる手法として重要な技術である[Li *et al.*, 2001a, Li *et al.*, 2001b]。

マウスやウサギなどにおいては GV 核置換の研究が行われており、核置換により作出した核置換卵から産子の作出も報告されている[マウス; Moffa *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2003、ウサギ; Li *et al.*, 2001c]。しかし、ブタの卵を用いて GV 置換を行い、作出した核置換卵からの産子の産出どころか、胚盤胞への発生についても報告はなされていない。GV 核置換を行うには、卵から卵丘細胞を除去することが必須である。しかし、第 1 章の結果より GV 期において卵丘細胞の除去を行った卵の成熟率は、卵丘細胞の除去を行わずに IVM を行った対照区に比べて有意に低下した($P < 0.05$)。つまり、ブタでは GV 期において卵丘細胞を除去した卵を安定して体外で成熟させる技術が確立されていないため、ブタ GV 置換を行うことは、作業効率や発生能の確保といった面で、実施するには相当な困難が予想される。そこで、成熟卵に核置換法(M-II 期核置換法)を適用することができるのであれば、十分な受精能や胚発生能が期待できると考えられる。

これまで、M-II 期の成熟卵を用いた核置換は、マウスにおいて研究が行われており、Liu *et al* はマウスの体外成熟卵の核を、除核された体内成熟卵の細胞質へと核置換を行うことで。得られた核置換卵は活性化刺激後の胚盤胞への発生を有していることを報告している[Liu *et al.*, 2003]。マウスにおいて M-II 期の核置換が確立されているが、これまでブタの成熟卵を用いた核置換の研究は報告されていない。

さらに核置換は、発生能を持たない卵の遺伝情報を維持するための手法のみならず、卵の成熟過程および胚盤胞への発生過程における核と細胞質の相互関係を調べる手法としても有効であると考えられる。現在、ウシの核移植胚ではレシピエントとなる

卵の細胞質量を増加させることで、核移植胚の胚盤胞の細胞数の改善が報告されている [Peura *et al.* 1998]。また、ウシのクローン胚の細胞質量の増加は胚盤胞の細胞数だけではなく胚盤胞への発生率も改善されることが報告されている [Tecirlioglu *et al.*, 2005]。これらのことから、ブタ核置換卵の胚盤胞への発生においても細胞質量が重要であることが考えられる。

通常、M-II 期核置換は顕微操作により行うことが一般的である。しかし、顕微操作は、操作技術の習得に多くの時間が必要となること、マニピュレーターなどの装置の設置に多くの費用がかかることが問題となる。しかし、Fahrudin *et al.* (2007) は遠心処理と電気融合を組み合わせた核移植技術 (Centri-Fusion 法) を確立した。Centri-Fusion 法では、透明帯を除去した成熟卵をパーコールの密度勾配を用いた遠心処理を行うことで、核を含む細胞質小片 (Karyoplast) と含まない細胞質小片 (Cytoplast) に分類し、その後、電気融合により再構築卵を作出することが可能である。そのため、顕微操作を回避し、さらに 1 度に多くの卵を操作することで操作時間を大幅に短縮できるという利点がある。また、融合させる Cytoplast の数を増やすことにより、作出した核置換卵の細胞質量を容易に増加させることが可能である。この方法により作出した核置換卵は、胚盤胞への発生能を有していることを報告している。Fahrudin *et al.* の報告によると、2 つの Cytoplast と卵丘細胞を融合させて作出した核置換卵の胚盤胞への発生率は約 5% であり、その細胞数は約 12 個であった。さらに、融合させる Cytoplast の数を 3 つにすることで、胚盤胞への発生率は約 11% まで改善され、また胚盤胞の細胞数も 33 個まで増加することを報告している。このことから、Centri-Fusion 法を用いて作出したブタ核移植卵のレシピエントの細胞質量は胚盤胞への発生率およびその細胞数を改善することが示唆された。

そこで、第 2 章ではこの Centri-Fusion 法を核置換に応用することで、ブタ卵の遠心・融合法を用いた核置換法の確立することを目指した。作出したブタ M-II 期核置換卵

の胚盤胞への発生率を改善することを目的として、遠心処理することで作出した Karyoplast1 個に融合させる Cytoplast の数を 0,1,2,3 および 4 個と増加させ、異なる細胞質量を持つ核置換卵を作出し、作出した核置換卵の細胞質量が、単為発生刺激後の雌性前核(Female pronuclear; FPN)形成能、IVF 後の MPN 形成を含めた受精および IVC 後の胚盤胞への発生に及ぼす影響を調べることにした。

【材料と方法】

本実験は麻布大学動物実験委員会の許可を得て行った。

<ブタ成熟卵の作出>

ブタ成熟卵は前章と同様の方法で作出した。すなわち、既報[Kikuchi *et al.*, 2002]に従って IVM を行い培養後、第一極体を放出した卵を成熟卵とし実験に供した。

<ブタ成熟卵からの細胞質小片の作出>

核置換は Fahrudin *et al.*(2007)の報告した Centri-Fusion 法を応用することで、核置換卵を作出した。パーコールの密度勾配を利用したブタ成熟卵からの細胞質小片の作出法を Fig. 4 に示した。38℃に加熱した TCM-199 が 300 μ l 入った 1.5 ml のマイクロチューブに約 100 個の成熟卵を移し、成熟卵内の脂肪を偏在化させるために、13,000 \times g で 9 分間遠心処理を行った(遠心処理-1)。遠心処理-1 後に、PBS にて 0.5%(w/v)に調整したプロナーゼ(Sigma)に成熟卵を 20~30 秒感作させた[Peura and Vajta, 2003]。成熟卵をプロナーゼに感作させることで透明帯をある程度分解させ(この時点で、透明帯は拡張するとともに球形を保てなくなり、結果的に中に存在する卵は不正形になる)、プロナーゼを含まない TCM-199 中に移し、ピペッティングをすることで透明帯を機

械的に完全に除去した。透明帯を除去した成熟卵は TCM-199 中で 2 回洗浄を行い、その後、5 $\mu\text{g/ml}$ のサイトカラシン B(CB)を含む TCM-199 にて 7.5、30 および 45%に調整したパーコール(Amersham Biosciences. Uppsala, Sweden)溶液(各 100 μl)が入ったマイクロチューブに 1 グループあたり約 100 個ずつ移した。パーコール溶液中にて 3 分間培養を行った後に、6,000 $\times g$ で 4 秒間遠心処理を行った(遠心処理-2)。遠心処理-2 を行った後、細胞質直径が 70 μm 以上の細胞質小片を TCM-199 に回収し、パーコールを除去するため TCM-199 で 2 回洗浄した。得られた細胞質小片は PBS で 5 $\mu\text{g/ml}$ に調整したヘキスト 33342(ヘキスト)で 20 分間染色を行った。ヘキスト染色後、蛍光顕微鏡(Olympus BX-51. Tokyo Japan)を使用して観察を行った。ヘキストにより M-II 期染色体塊(核板)が観察された細胞質小片を karyoplast(K)、核板が観察されなかった細胞質小片を cytoplast(C)として、細胞質小片の選別を行った。細胞質を選別後、核置換卵の作出まで TCM-199 中にて培養を行った。また、遠心処理-1 のみを行い、透明帯を除去した成熟卵を使用した対照区を設定した。

<電気融合による核置換卵の作出>

遠心処理-2 により得られた karyoplast はヘマグルチニン(300 $\mu\text{g/ml}$ in PBS)を用いて、実験計画に従い cytoplast と接着させた。その後、融合・活性化液であるマンニトール(0.28 M d-mannitol, 0.05 mM CaCl_2 , 0.1 mM MgSO_4 および 0.01%(w/v)BSA) [Nakai *et al.*, 2006]と TCM-199 を混合して、段階的に(マンニトール : TCM-199 = 1 : 2, 2 : 1 および 3 : 0)核置換卵を洗浄した。電極間の距離が 2 mm 幅の細胞融合用チャンバー(FTC-23W, Shimadzu, Kyoto, Japan)に約 300 μl の活性化液と共に各試験区の核置換卵を移した。その後、チャンバーを細胞融合装置(SSH-10, Shimadzu, Kyoto, Japan)に接続し、電極間の抵抗が 3.0 k Ω となるように、液量を調整し、1.5 kV/cm、20 μsec の直流電流を 1 回付与し、融合処理を行った。その後、IVC-PyrLac で 3 回洗浄を行った後、細胞質小片が

融合するまで1時間培養を行った。

<細胞質小片の融合状態の確認>

直流電流による細胞融合刺激を付与した1時間後に、融合が確認された核置換卵を実体顕微鏡下で選別し各試験区の融合率を観察し、その後融合卵を IVC-PyrLac から TCM-199 に核置換卵を移して、倒立顕微鏡下で対照区および核置換卵の直径を測定した。

<核置換卵の雌性前核(FPN)形成能の評価>

融合刺激後の核置換卵は FPN 形成能の評価を行った。通常、受精は精子が卵に侵入することで誘起される Ca イオンの変動が引き起こされることで生化学的に進展するものであるが、FPN 形成能の評価は、受精の際の精子側の MPN 形成などの要因を除外することで、卵自体の FPN 形成を指標として、正確に活性可能を有しているかを調べるために行った。対照区および各試験区(K 区～K + 4 C 区)の核置換卵に、融合・活性化液であるマンニトール液を用いて 0.8 kV/cm、30 μ sec の条件にて直流電流を2回付与し、単位発生刺激を行った。電気刺激後、対照区および各試験区の核置換卵は、IVC-PyrLac に 5 μ g/ml の CB を添加した培地で2時間培養を行い、第二極体放出の抑制を行った。2時間後、IVC-PyrLac にて3回洗浄後、Vajta *et al.*(2000)の報告にしたがい Well of well (WOW) system を用いて IVC を行った。WOW system は4穴シャーレにアグリゲーションニードル(DN-09, Biological Laboratory Equipment, Maintenance and Service Ltd. Hungary)を使用して、1穴あたり25個ずつスポットを作製した。WOW system ではブタやウシでは胚発生能の改善が報告されている。また、核置換卵を1つ1つ個別のスポットの中で培養するため、卵同士の接着とそれによるさらなる融合を防ぐことが可能である。その後、IVC-PyrLac を 400 μ l 加え、ミネラルオイルを 100 μ l

加え、オイルカバーの状態で培養した。単為発生刺激 10 時間後に既報により固定・染色を行い、位相差顕微鏡下で核置換卵の雌性前核形成を観察し、FPN 形成率を算出した。

<核置換卵の IVF および IVC>

対照区および各試験区の核置換卵は、第 1 章の方法と同様に Kikuchi *et al.*(2002)に従い、IVF および IVC を行った。IVF は精子と受精させることで、胚発生に必要な精子側の要因(DNA、卵活性化因子)を含めて卵を評価することが可能となる。IVF 開始 3 時間後に、各試験区の卵はピペッティングを行うことで周りについた余分な精子を取り外し、IVC-PyrLac で 3 回洗浄し WOW system を用いて IVC を行った[Vajta *et al.*, 2000. Fig. 5]。IVF 開始 10 時間後に、対照区および各試験区の受精卵の 1 部を固定・染色し、受精能(精子侵入率、単精子受精率および MPN 形成率)の評価を行った。精子尾部 1 つと精子頭部もしくは MPN 形成が卵細胞質内に 1 つ存在し、第二極体の放出が認められた卵を単精子受精卵とした。固定を行わなかった残りの受精卵はさらに IVC を行い、IVF を行った日を Day 0 とし、Day 0 から Day 2 までは IVC-PyrLac で、Day 2 から Day 6 までは IVC-Glu で IVC を行なった。6 日間培養後に固定・染色し、胚盤胞腔を形成した胚を胚盤胞とし、対照区および各試験区の胚盤胞形成率およびその細胞数の観察を行なった。

<実験計画>

本研究において、核置換卵の細胞質量が単為発生誘起処理後の FPN 形成率、IVF 後の受精率および胚発生率に及ぼす影響を調べるため、以下の試験区を設定した。

- 対照区 COCs を遠心処理-1 後に、プロナーゼを用いて透明帯を除去した区。
- K 区 遠心処理-2 後に得られた karyoplast に融合刺激を付与した区。
- K + 1 C 区 遠心処理-2 後に得られた karyoplast1 つに、cytoplast を 1 つ融合させた区。
- K + 2 C 区 遠心処理-2 後に得られた karyoplast1 つに、cytoplast を 2 つ融合させた区。
- K + 3 C 区 遠心処理-2 後に得られた karyoplast1 つに、cytoplast を 3 つ融合させた区。
- K + 4 C 区: 遠心処理-2 後に得られた karyoplast1 つに、cytoplast を 4 つ融合させた区。

<統計処理>

統計処理は前章と同様の手順で行った。対照区および各試験区の卵の融合率、単為発生誘起処理後の FPN 形成率、IVF 後の精子侵入率、単精子受精率、MPN 形成率および胚盤胞への発生率はアークサイン変換を行なった。その後、核置換卵の細胞質直径および胚盤胞の細胞数を加えた全ての結果は、SAS の GLM を使用し、一元配置の分散分析を行い、解析モデルに有意差が認められた場合、引き続きダンカンの多重比較検定を行った。

【結果】

<核置換卵の融合率と直径>

各試験区(K 区～K + 4 C 区)および対照区の融合率と卵の直径を Table 5 に示した。K + 1 C 区の融合率(100.0%)は K + 2 C 区(71.3%)、K + 3 C 区(73.1%)および K + 4 C 区

(46.9%)と比べて有意に高い値を示した($P < 0.05$)。また、K + 2 C 区、K + 3 C 区および K + 4 C 区の融合率において各試験区間に有意な差は認められなかった。核置換卵の直径は融合させる cytoplasm の数を増やすことで増加し K + 4 C 区(127.1 μm)において、対照区(110.5 μm)および他の試験区(75.0~117.4 μm)に比べて高い値となった($P < 0.05$)。また、各試験区間に有意な差が認められた。対照区の卵の直径は K + 2 C 区(108.5 μm)とほぼ同じ大きさとなった。

<核置換卵の FPN 形成能>

対照区および各試験区の FPN 形成率を Table 6 に示した。単為発生刺激後、FPN 形成率は対照区(66.0%)および各試験区間(58.2%~77.4%)に有意な差は認められなかった。

<IVF 後の受精能>

対照区および各試験区の精子侵入率、単精子受精率および MPN 形成率は Table 7 に示した。精子侵入率は、添加した cytoplasm の数に関わらず、対照区(78.0%)および各試験区の(74.3%~93.8%)に有意な差は認められなかった。単精子受精率において K 区(61.6%)が対照区(32.9%)、K + 1 C 区(25.6%)、K + 2 C 区(34.9%)、K + 3 C 区(18.2%)および K + 4 C 区(19.2%)に比べて有意に高い値を示した($P < 0.05$)。また、MPN 形成率は対照区(96.6%)および各試験区間(92.3%~97.4%)に有意な差は認められなかった。

<IVF/IVC 後の胚盤胞への発生能>

対照区および各試験区の胚盤胞への発生率およびその細胞数を Table 8 に示した。核置換卵の IVF/IVC 後の胚盤胞への発生率はそれぞれ、K 区(0.0%)、K + 1 C 区(2.5%)、K + 2 C 区(4.7%)、K + 3 C 区(9.8%)および K + 4 C 区(15.3%)となり、融合させる cytoplasm

の数が多くなるに従って有意に高くなった($P < 0.05$)。K + 4 C 区の胚盤胞への発生率は対照区(17.8%)と比較して有意な差は認められなかった。本研究において、K 区からは胚盤胞の形成は確認できなかった。胚盤胞の細胞数において、対照区(26.2 個)は K + 1 C 区(7.5 個)および K + 2 C 区(8.3 個)と比較して有意に高い値を示した($P < 0.05$)。しかし、K + 3 C 区(16.0 個)および K + 4 C 区(15.3 個)と比べて有意な差は認められなかった。また、全ての試験区間に有意な差は認められなかった。

【考察】

本研究では、ブタ核移植胚作製において開発されたCentri-Fusion法の応用である、ブタM-II期卵を用いた核置換卵作出において、作出した核置換卵はIVF後の胚盤胞への発生能を有していることが明らかとなった。Centri-Fusion法を用いた核置換卵の作出は、容易に短時間で、かつ、1度に多くの核置換卵を作出することが可能であるため、非常に有効な手法であると考えられる。Centri-Fusion法による、核移植胚および核置換卵の作出は他の動物種では報告されていない。そのため、ブタ以外への動物種へ応用することで、新たな知見の報告に繋がると考えられる。

本章の結果から、核置換卵の融合率は融合させるCytoplasmの量を増加させるに従って低下し、K + 1 C区では100%であったのに対し、K + 4 C区において46.9%となり、他の核置換区と比較して有意に低い値を示した($P < 0.05$)。細胞質の融合には融合時に融合率が低下した原因として、細胞同士の融合には接着面を直流電流に対して、垂直に電気を流す必要がある。そのため、融合させる細胞質を増やすことで細胞質小片の接着面が増えるため、融合刺激である直流電流が、いくつかの接着面に対して垂直に流れなかったことが考えられる。さらに、電気融合後の各試験区の核置換卵直径は各試験区間($P < 0.05$; 75.0 μm ~ 127.1 μm)に有意な差が認められた。しかし、K + 2 C区の核置換卵の直径は対

照区と比較して有意な差が認められなかった(Table 5)。本研究において、パーコールを用いた遠心処理において成熟率はCytoplasm、Karyoplast、および脂肪の3つに分離したため、K + 2 C区が対照区と同等の大きさになったものであると考えられる。また、核置換卵の細胞質量は単為発生誘起処理後のFPN形成卵率、IVF後のMPN形成卵率および精子侵入卵率に有意な差は認められなかった。しかし、単精子受精卵率においてK区が他の核置換区と比べて有意に高い値を示した($P < 0.05$)。K区は他の試験区と比較して表面積が狭いことで、受精の機会が減少したため単精子受精卵率が高くなった原因の1つであると考えられる。Wakayama and Yanagimachi(1998)は、マウスにおいて未受精卵の細胞質量を1/8まで減少させても、その卵には受精能が備わっていることを報告した。本研究においても、対照区のM-II期卵より細胞質量の少ないKおよびK + 1 C区において対照区および他の核置換区と比べて精子侵入率およびMPN形成率に有意な差が認められなかったことから、細胞質量は精子侵入およびMPN形成の受精能に影響しないことが考えられる。

ただし、6日間IVCを行った結果、K区は胚盤胞の形成が認められなかった。しかし、細胞質小片を添加した区(K + 1 C区、K + 2 C区、K + 3 C区および K + 4 C区)では胚盤胞の形成が認められた。Centri-Fusion法により作出した細胞質量が異なる核置換卵は、核置換卵の細胞質量が増加に従い、IVF/IVC後の胚盤胞への発生率が改善され、K + 4 C区においては対照区と比較して有意な差は認められなかった。また、胚盤胞の平均細胞数は細胞質量が多い核置換卵由来の胚盤胞ほど多い傾向が認められた。これまで、ブタやウシのクローン胚において、胚の細胞質量が胚盤胞への発生へ及ぼす影響について様々な検討が行われてきた。ウシのクローン胚において、レシピエント卵の細胞質量を増加させることで、核移植後のクローン胚の胚盤胞細胞数が増加すること[Peura *et al.*, 1998]、さらにウシのクローン胚の細胞質量の増加は胚盤胞の細胞数だけではなく胚盤胞への発生率も改善されることが報告されている [Tecirlioglu *et al.*, 2005]。また、Fahrudin *et al.*(2007)の報告においてもCentri-Fusion法を用いて作出したブタのクローン胚において

も、卵丘細胞とcytoplasmを2つ融合させたクローン胚の胚盤胞への発生率が5.2%であったのに対し、cytoplasmを3つ融合させた区では10.6%となり、胚盤胞への発生率は有意に増加する結果が得られている。また、この報告においては胚盤胞の細胞数においてもcytoplasmを3つ融合させた区が、2つ融合させた区に比べて有意に多い結果が報告されている。本研究において、細胞質量増加が胚盤胞への発生能の改善および胚盤胞細胞数の改善に有効な影響を及ぼしたことは、これまでの報告と同様な結果となった。しかし、Wakayama and Yanagimachi(1998)は、マウスの未受精卵の細胞質量を1/2まで減少させても、その卵は受精および胚盤胞への発生能を有し、さらには産子まで発育することを報告した。また、Wakayama *et al.*(2004)はマウス未受精卵の細胞質量を増加させた後、卵細胞質内精子注入法(Intra cytoplasmic sperm injection; ICSI)により作出したICSI卵の胚盤胞への発生率は、細胞質を増加させずにICSIを行った区と比較して差は無いことを報告した。マウスにおいては未受精卵の細胞質量は受精および胚盤胞への発生に重要ではないことが考えられる。これらの報告により、細胞質量が胚盤胞への発生に及ぼす影響には種差があると考えられる。

ブタ成熟卵を用いたM-II期核置換はこれまで報告されておらず、本研究がブタ核置換卵由来の胚盤胞作出の初めての報告となった。また、ブタ核置換卵において核置換卵の細胞質量は胚盤胞への発生およびその細胞数を改善する要因であることも本研究において明らかとなった。

これまで胚盤胞の発生には卵の皮質に含まれるleptin and STAT 3が重要であると報告されている[Antczak and Blerkom. 1997]。また、第1章においてもブタの受精および胚発生にはGSHが重要な役割を有していることを報告した[Maedomari *et al.*, 2007]。本研究では直接検討していないが、K区、K + 1 C区およびK + 2 C区の核置換卵ではleptin、STAT 3についても、GSH量と同様に試験区では対照区と比較して低下していたことも考えられる。さらに、Centri-Fusion法では遠心時の卵への物理的なストレスなどによ

り発生率の低下を引き起こしたことも考えられる。また、再構築した核置換卵には、通常、ブタ卵細胞質内に存在する脂肪滴が、卵の断片化处理により除去されている。ブタ卵の胚発生には脂肪滴も重要な役割を示している可能性も考えられる。

また、核置換区で胚盤胞への発生率が低下した原因として、細胞質内の細胞小器官(ミトコンドリア)などの構成が異なっていたことが考えられる。El Shourbagy *et al.*(2006)はブタ卵の受精においてミトコンドリアDNA(mtDNA)のコピー数が重要であると報告した。この報告において、発生率の高いブタ成熟卵のmtDNA数は発生能が低い成熟卵と比較して高いことが報告されている。本研究では、遠心処理を2回行うことで、作出した細胞質小片にミトコンドリアを多く含むものと、その数が少ないものが出来た可能性も考えられる。ミトコンドリア数が少ない細胞質小片を融合させたことで、核置換卵の胚盤胞への発生が低下した可能性も考えられる。

第2章では、ブタ核置換卵の胚発生には核置換卵の細胞質量が重要であることが示唆された。しかし、遠心時の卵へのストレス、脂肪の除去が胚発生に影響することもあると考えられる。そこで、第3章では、成熟卵自体の細胞質量を増加させるために、透明帯を除去したブタ成熟卵にCytoplasmを添加することで、細胞質添加卵を作出し胚発生能の改善を検討した。

第3章

ブタ M-II 期卵への細胞質小片添加による胚発生能の改善に関する研究

【序論】

第 2 章において、Centri-Fusion 法をブタ成熟卵に応用した場合、作出された核置換卵は胚盤胞への発生能を有していることが明らかとなり、この手法により比較的容易に核置換卵を作出することが可能となった。これまで、Fahrudin *et al.*(2007)の報告においてもブタ核移植卵においても卵丘細胞と融合させる Cytoplast の数を 3 つにすることで、Cytoplast を 2 つ融合させた時の核移植胚よりも胚盤胞の発生率および細胞数が増加することが報告されている。さらに、ウシの核移植胚においてもレシピエントとなる除核卵の細胞質量は胚盤胞の発生およびその細胞数の増加に影響することが報告されている[Peura *et al.* 1998, Tecirlioglu *et al.*, 2005]。さらに第 2 章において報告したように、Centri-Fusion 法を応用し作出したブタ核置換卵の IVF 後の胚盤胞への発生率は、融合させる Cytoplast の数を増加することで核置換卵の細胞質量を増加させるにしたがって高くなった。これらの結果から、ブタ M-II 期の核置換卵の胚盤胞への発生能にはレシピエントとなる Cytoplast の量が重要であることが示唆された。つまり、ブタ M-II 期の卵の細胞質量を増加することで成熟卵の IVF 後の胚盤胞への発生を改善することが考えられる。さらに、これまで、ウシの成熟卵の M-II 期の核に紫外線(UV)を照射することで、単為発生刺激後に異常が発生し、また、M 期促進因子(MPF)活性の低下が制御されてしまうこと、また IVF 後の雌性前核形成においても染色体の凝集などの異常が認められると報告した[Bradshaw *et al.*, 1995]。また、Smith *et al.*(1993)はブタ成熟卵へ UV 照射することで、細胞膜および細胞構成の変化、メチオニンの結合の減少、たんぱく質合成の変化が起きることを報告した。さらに、魚類では(ニジマス)の精子に UV を照射し、その照射時間を延長することで精子頭部の DNA の断片化が引き起こされるだけでなく、その後の胚発生の低下を引き起こすことが報告されている[Dietrich *et al.*, 2005]。第 2 章の核置換の操作において、Karyoplast と Cytoplast に分類する際の核染色のため UV の照射を必要とすることから、この M-II

期核への UV 照射が核置換卵の IVF 後の胚盤胞の発生率の低下を引き起こすことが考えられる。もし仮に M-II 期核への UV 照射を回避すれば、核置換後の胚発生が期待される。

そこで、これら 2 つの問題点を回避するための簡便かつ確実な手法として以下のよう手法を考案した。既報に従って、屠場卵巢由来の成熟卵を作出し、成熟卵の透明帯を除去した後、Cytoplasm を添加する対象卵(O)とした。O へ第 2 章の方法に従って作出した Cytoplasm を融合することで細胞質添加卵を作出した。この手法を用いることで、対象卵に確実に胚発生を支持する細胞質を容易に添加することが可能で、かつ M-II 期核への UV 照射を回避することが可能となる。そこで、第 3 章では本手法を用いて細胞質添加卵を作出し、細胞質添加卵の単為発生誘起処理後および IVF 後の胚盤胞への発生能の検討を行った。

【材料と方法】

本実験は麻布大学動物実験委員会の許可を得て行った。

<ブタ成熟卵の作出>

ブタ成熟卵は第 1 章と同様に Kikuchi *et al.*(2002)に従って IVM を行い培養後、第一極体を放出した卵を成熟卵とし、対象卵および添加する細胞質小片の作出に供した。屠場由来の卵巢から IVM 後に作出した成熟卵の透明帯を第 2 章の方法と同様に、プロナーゼ処理とピペッティングにより透明帯を除去した。その後、TCM-199 にて 2 回洗浄後、対照区として用いた。

<添加する細胞質小片の作出>

細胞質小片の作出は第2章の方法と同様に、遠心処理-1 およびパーコールの密度勾配を用いた遠心処理-2 を行うことで、ブタ成熟卵から細胞質小片を作出した。得られた細胞質小片はヘキスト染色を行い、蛍光顕微鏡を使用して観察を行った。ヘキストにより M-II の核板が観察された細胞質小片と、核板が観察されなかった細胞質小片 (Cytoplasm; C) を観察し、C のみを選別、回収した。その後、屠場由来の卵巣から作出した成熟卵と融合させるまで TCM-199 中にて保存した。

<細胞質添加卵の作出>

透明帯を除去した対象卵および Centri-Fusion 法を応用して作出した細胞質小片(C) を第2章の方法と同様にヘマグルチニン中で接着させた(Fig. 7)。その後、融合・活性化液であるマンニトールと TCM-199 を第2章の方法と同様に混合して、段階的に対照区の成熟卵および細胞質添加卵を洗浄した。細胞融合用チャンバーに約 300 μ l の活性化液と共に細胞質添加卵を移した。その後、チャンバーを細胞融合装置に接続し、電極間の抵抗を調整し、1.5 kV/cm、20 μ sec の直流電流を1回付与し、融合処理を行った。その後、IVC-PyrLac で3回洗浄を行った後、細胞質小片が成熟卵と融合するまで1時間培養を行った。

1時間後に、融合が確認された細胞質添加卵を実体顕微鏡下で選別し、各試験区の融合率を観察し、その後、IVC-PyrLac から TCM-199 に核置換卵を移して、倒立顕微鏡下で対照区および細胞質添加卵の直径を測定した。また、透明帯の除去を行い、融合刺激を行わなかった成熟卵を対照区として実験に供した。

<細胞質添加卵の単為発生能の評価>

融合刺激後の細胞質添加卵は、電気刺激による単為発生誘起後に IVC を行い発生能の評価を行なった。対照区および細胞質添加区は、0.8 kV/cm for 30 μ sec の条件に

て直流電流を2回付与し、単位発生刺激を行った。電気刺激後、対照区および細胞質添加区の卵は、IVC-PyrLacに5 µg/mlのCBを添加した培地で2時間培養を行い、第二極体放出の抑制を行った。3時間後、IVC-PyrLacにて3回洗浄後、WOW systemを用いてIVCを行った[Vajta *et al.* 2000]。単為発生刺激を行なった日をDay 0とし、Day 0からDay 2まではIVC-PyrLacで、Day 2からDay 7まではIVC-GluでIVCを行なった。IVC開始7日目に既報により固定・染色を行い、位相差顕微鏡下で観察後、胚盤胞腔が確認された胚を胚盤胞として、対照区および細胞質添加区の胚盤胞形成率およびその細胞数の観察を行なった。

<細胞質添加卵のIVFおよびIVC>

対照区および各試験区の細胞質添加卵は、第1章の方法と同様に既報に従ってIVFを行った[Kikuchi *et al.*, 2002]。IVF開始3時間後に、各試験区の卵はピペッティングを行うことで周りについた余分な精子を取り外し、IVC-PyrLacで3回洗浄しWOW systemを用いたIVCを行った。IVF開始10時間後に、対照区および各試験区の受精卵の一部を固定・染色し、受精能(精子侵入率、単精子受精率およびMPN形成率)の評価を行った。また、残った受精卵はさらにIVCを行った。IVFを行なった日をDay 0として、Day 0からDay 2まではIVC-PyrLacにて、Day 2からDay 7まではIVC-GluでIVCを行い、7日間培養後に固定・染色し、胚盤胞腔が確認された胚を胚盤胞として、胚盤胞形成率およびその細胞数の観察を行なった。

<実験計画>

本研究において、細胞質添加卵の細胞質量が単為発生誘起処理後の FPN 形成率、IVF 後の受精率および胚発生率に及ぼす影響を調べるため、以下の試験区を設定した。

対照区 成熟卵の透明帯を除去し、細胞融合刺激を付与しなかった区。(Fig. 8A)

O 区 成熟卵の透明帯を除去し、細胞融合刺激を付与した区。

O + 1 C 区 透明帯を除去した成熟卵に、cytoplasm を 1 つ融合させた区。(Fig. 8B)

O + 2 C 区 透明帯を除去した成熟卵に、cytoplasm を 2 つ融合させた区。(Fig. 8C)

O + 3 C 区 透明帯を除去した成熟卵に、cytoplasm を 3 つ融合させた区。(Fig. 8D)

<統計処理>

統計処理は第 1 章と同様の方法で行った。対照区および各細胞質添加区の卵の融合率、単為発生誘起処理後の FPN 形成率、IVF 後の精子侵入率、単精子受精率、MPN 形成率および胚盤胞への発生率はアークサイン変換を行なった。その後、細胞質添加卵の細胞質直径および胚盤胞の細胞数を加えた全ての結果は、SAS の GLM を使用した一元配置の分散分析を行い、解析モデルに有意差が認められた場合、引き続きダンカンの多重比較検定を行った。

【結果】

<細胞質添加卵の融合率と直径>

対照区および各試験区(O 区、O + 1 C 区、O + 2 C 区および O + 3 C 区)の融合率と

卵の直径を Table 9 に示した。O + 1 C 区の融合率(100.0%)、O + 2 C 区(93.4%)および O + 3 C 区(98.3%)において各試験区間に有意な差は認められなかった。細胞質添加卵の直径は融合させる cytoplasm の数を増やすことで有意に増加し O + 3 C 区(129.7 μm)は、O 区(105.8 μm)、対照区(106.7 μm)、O + 1 C 区(113.9 μm)および O + 2 C 区(121.6 μm)に比べて高い値となった($P < 0.05$)。また、O + 2 C 区および O + 1 C 区は O および対照区と比較して有意に高い値を示した($P < 0.05$)。さらに、O + 1 C 区は O 区および対照区と比較して有意に高い値を示した($P < 0.05$)

<単為発生誘起処理後の胚盤胞への発生能>

対照区および各試験区(O 区、O + 1 C 区、O + 2 C 区および O + 3 C 区)の単為発生誘起処理後の胚盤胞への発生率およびその細胞数を Table 10 に示した。対照区(15.0%)および各試験区間(O 区～O + 3 C 区; 17.8～26.1%)との間に有意な差は認められなかった。また、得られた胚盤胞の細胞数を観察した結果、対照区および各試験区間に有意な差は認められなかった(21.6～39.4 個)。

<IVF/IVC 後の胚盤胞への発生能>

対照区および各試験区(O 区～O + 3 C 区)の IVF 後の胚盤胞への発生率およびその細胞数を Table 11 に示した。その結果、対照区(14.6%)と O 区(16.0%)の間に有意な差は認められなかった。また、O + 1 C 区 (34.1%)、O + 2 C 区(31.6%)および O + 3 C 区(26.9%)間においても有意な差は認められなかった。しかし、各細胞質添加区の IVF/IVC 後の胚盤胞への発生率は対照区および O 区と比較して有意に高い値を示した($P < 0.05$)。しかし、得られた胚盤胞の細胞数を観察した結果、対照区および各試験区間に有意な差は認められなかった(35.9～58.6 個)。

【考察】

第3章の結果では、対象卵に Centri-Fusion 法のパーコールの密度勾配を利用した遠心により作出した細胞質小片を添加することで細胞質量を増加させた細胞質添加卵を作出することが確認された。さらに、細胞質添加卵の単為発生および IVF 後の胚盤胞への発生能を調べた。屠場卵巢由来の成熟卵を用いて細胞質添加卵を作出し、細胞質添加卵の融合率および卵直径を調べたところ、融合率は各試験区間に有意な差は認められなかった(O + 1 C 区～O + 3 C 区; 93.4%～100.0%)。細胞質添加卵において融合させる細胞質量を増加させても、その融合率に有意差が認められなかったことは、第2章において行った、Centri-Fusion 法を応用した核置換よりもその作出効率が良いと考えられる。本章で行った細胞質添加卵が第2章の核置換卵と比べて、その IVF 後の胚発生能が改善された要因として、細胞質添加卵では Centri-Fusion 法を応用した核置換卵と比べて卵と細胞質小片の接着面の数が少ないことで、融合刺激時に、接着面を直流電流に対して垂直に設置しやすかったのではないかと考えられる。次に、卵直径を調べた結果、融合させる細胞質小片の数を増やすにしたがって大きくなり($P < 0.05$)、第2章と同様の結果となった。このことから、対象卵へ細胞質小片を添加することで、細胞質量を増加した卵を作出することが可能であることが明らかとなった。電気融合後に得られた細胞質添加卵の電気刺激による単為発生能を調べた結果、O 区(17.8%)、O + 1 C 区(26.1%)、O + 2 C 区(22.8%)および O + 3 C 区(18.5%)となり各試験区間に有意な差は認められなかった。また、対照区(15.0%)と各試験区間にも有意差が認められなかった。本章で使用した屠場卵巢由来の成熟卵は本来細胞質成熟が進行しているため、細胞質小片の添加により改善の程度が比較的小さかったものと考えられる。

さらに、IVF/IVC 後の胚盤胞への発生率を調べた結果、全ての細胞質を添加した試験区の胚盤胞への発生能は、対照区および O 区よりも有意に高い値を示した。細胞質添加卵が IVF 後の胚盤胞への発生において対照区および細胞質を添加しない区(O

区)より高い胚盤胞への発生能を示したことは、卵細胞質内のミトコンドリアなどの細胞小器官やメッセンジャーRNA(mRNA)などの母性因子などが細胞質を添加することで増加したことが考えられる。ミトコンドリアの働きとして、ATPの産生が知られている。ATPは細胞のエネルギー源であり、卵の減数分裂の再開および活性化、その後の受精や胚発生において必要である。また、mRNAはタンパク質合成に深く関係することが知られている。ミトコンドリアやmRNAが細胞質小片に含まれており、その細胞質小片を融合させることで、それら胚盤胞への発生に必要な要因の増加が、胚盤胞への発生を改善したことが考えられる。しかし、Wakayama *et al.*(2004)の研究においてマウスの成熟卵の細胞質量を増加させた後にICSIを行い、その後の胚盤胞への発生を調べた結果、胚盤胞への発生を調べた結果、細胞質量は発生に影響を及ぼさないことを報告している。成熟卵の細胞質量が受精後の胚盤胞への発生に及ぼす影響においては種差があることが考えられる。

本章において、ブタ成熟卵への細胞質小片の添加は成熟卵の胚発生を改善することが明らかとなった。この技術を細胞質成熟が不十分なブタ卵へ応用することで、発生能の改善が見込まれる。細胞質成熟が不十分なブタ成熟卵の1つの例として、ヌードマウスへXenograftした卵巣から得られた成熟卵がある[Kikuchi *et al.*, 2006]。このXenograft卵巣由来のブタ成熟卵を用いて、本研究において成熟卵の胚発生が認められたCentri-Fusion法を応用した核置換および成熟卵への細胞質小片の添加を行うことで、それぞれ核置換卵および細胞質添加卵を作出し、細胞質成熟が不十分な成熟卵の胚盤胞への発生能の改善をが期待される。そこで、第4章では実際にXenograft卵巣由来のブタ成熟卵を用いて、核置換および細胞質添加を行い、その発生能の改善の検討を行うこととした。

第4章

異種移植ブタ卵巢由来の成熟卵を用いた核置換と
細胞質添加による胚発生能改善に関する研究

【序論】

第2章および第3章においての実験において、屠場卵巢由来のブタ成熟卵から Centri-Fusion 法を用いて Karyoplast および Cytoplast 作出することが可能であり、得られた Karyoplast および Cytoplast を用いることで作出した核置換卵および細胞質添加卵は、それぞれ単為発生および IVF 後の胚盤胞への発生が確認された。さらに、これらの結果から、ブタ核置換卵および細胞質添加卵の IVF 後の胚盤胞への発生には再構築卵の細胞質量が重要であることも示唆された。

現在、Kikuchi *et al.*(2006)の報告においてヌードマウスへブタ胎子から回収した卵巢をヌードマウスの腎皮膜下へ異種移植(Xenograft)を行うことで、ヌードマウス生体内で原始卵胞から胞状卵胞まで発育させることが可能であり、さらに、その卵胞から回収した卵は IVM を行うことで成熟卵の作出が可能であることが明らかにされている。その報告において、IVF/IVC 後に多くの胚は1細胞期において発生を停止すると報告されている。また、Kaneko *et al.*(2006)は Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵に IVF/IVC を行うことで、胚盤胞を得ることに成功したが、その発生率は1%以下と低率であった。IVF 後に胚盤胞に発生しない原因の1つに、胚発生を支持する成熟卵の細胞質成熟が不十分であることが知られている [Nagai. 2000]。

第2章および第3章において検討した、Centri-Fusion 法を応用した核置換および成熟卵への細胞質小片の添加は、核置換卵および細胞質添加卵とも IVF 後の胚盤胞への発生が認められた。しかし、成熟卵の胚盤胞への発生能を大幅に改善する結果は得られなかった。屠場卵巢由来の成熟卵は本来、細胞質成熟が十分に進行していたため、胚発生能の改善効果が小さかったことが示唆される。しかし、Xenograft 卵巢由来の成熟卵などの細胞質成熟が不十分な卵へ、核置換および細胞質添加技術を適応することで、細胞質成熟を付与し胚発生能を改善することが期待される。

そこで、第4章では実験1として実際に、Xenograft 卵巢由来の成熟卵を用いて、

屠場卵巢由来の成熟卵からパーコールの密度勾配を利用した遠心処理により作出した Cytoplast と、Xenograft 卵巢由来の成熟卵から作出した Karyoplast を融合させることで、核置換卵を作出し、核置換卵の単為発生誘起処理後の発生能を調べた。

さらに、実験 2 では屠場卵巢由来の成熟卵から、パーコールの密度勾配を利用した遠心処理により作出した Cytoplast を、Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵に添加することで細胞質添加卵を作出し、同様に単為発生誘起処理後の発生能の検討を行った。さらに、細胞質添加卵に IVF を行い、受精後の胚盤胞への発生能を検討した。

【材料と方法】

本実験は麻布大学の実験動物委員会の許可を得て行った。

<ヌードマウスへのブタ卵巢の移植>

ヌードマウスへの卵巢組織のXenograftはKaneko *et al.*(2003)の報告に従って行った。ドナーのブタ卵巢は畜産草地研究所で生まれた三間交雑種のブタ新生子より採取した。20日齢のブタ卵巢に含まれる全卵胞の96%は原始卵胞であり、組織検査の結果、全ての卵胞は初期卵胞で発育が休止していた[Kaneko *et al.*, Reproduction. 2003]。ブタ新生子から卵巢を摘出直後に皮質を切り出した。切り出した皮質は、668 unit/mlのペニシリン(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)と、0.2 mg/mlのストレプトマイシン(Sigma)を含む生理食塩水中で約1.5 × 1.5 mmの小片に切り分けた。卵巢を移植するレシピエント動物として、5～6週齢の雌の免疫不全マウス(Crlj:CD1-Foxn1nu; Charles River Japan, Yokohama, Japan)を用いた。ヌードマウスの卵巢を麻酔後に切除した。腎皮膜下にピンセットで小さな穴を開け、約10個の卵巢組織片を両腎皮膜下に移植した。卵巢小片を移植50～70日後に、膣が開口し、角化したスメア像が観察されたマウスを

実験に供した。膣開口60日後に、62.5 unit/mlのブタ卵胞刺激ホルモン(FSH; Sigma)を含むAlzet osmotic pump(model 2004, DURECT Corp, Cupertino, CA, USA)を移植することで、14日間FSHによるホルモン処理を行った。その後、黄体形成ホルモン(LH)サーージ様放出を抑制するため、FSH投入開始7日後に抗エストラジオールヤギ血清(Kaneko *et al.*, 1995, 2002)を100 μ lを腹腔内投与した。FSH投入14日後に、マウスを安楽死後に、移植したブタ卵巢を回収した。回収した卵巢に含まれる卵胞から直径115 μ m以上のブタ未成熟卵を選別し、IVMに供した。

<Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵の作出>

異種移植卵巢由来のブタ成熟卵および屠場卵巢由来のブタ成熟卵は第1章と同様の方法で作出した。すなわち、既報[Kikuchi *et al.*, 2002]に従ってIVM を行い培養後、第一極体を放出した卵を成熟卵とし、実験に供試した。

実験 1: Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵を用いた核置換

<Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵からの Karyoplast の作出>

Xenograft 卵巢由来のブタ成熟卵を第2章と同様に Centri-Fusion 法を応用することで[Fahrudin *et al.*, 2007]、細胞質小片を作出した。得られた細胞質小片はヘキスト染色を行い、蛍光顕微鏡を使用して観察を行い、M-II 期核を含む細胞質小片(Xeno-K)を選別、回収した。作出した Xeno-K は M-199 で2回洗浄を行い、さらに屠場卵巢由来の成熟卵の細胞質小片との核置換を行うまで M-199 中にて保持した。

<屠場卵巢由来のブタ成熟卵からの Cytoplast の作出>

屠場卵巢由来のブタ成熟卵を第2章の方法と同様に Centri-Fusion 法を応用することで、細胞質小片を作出した。得られた細胞質小片はヘキスト染色を行い、蛍光顕微鏡

を使用して観察を行い、ヘキストにより M-II 期の核板が観察されなかった細胞質小片(Cytoplast; C)のみを選別、回収した。

<Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵を用いた遠心・融合による核置換卵の作出>

電気融合による核置換卵の作出は第 2 章と同様の方法で行なった。Xeno-K を 1 つと、屠場由来の C を 2 あるいは 3 つを、マグルチニン中で接着させ、それぞれ、Xeno-K + 2 C 区および Xeno-K + 3 C 区とした。その後、融合・活性化液であるマンニトールと TCM-199 を混合して、段階的に核置換卵を洗浄した。細胞融合用チャンバーに約 300 μ l の活性化液と共に核置換卵を移した。その後、チャンバーを細胞融合装置に接続し、電極間の抵抗を 3.0 k Ω となるように調整し、1.5 kV/cm、20 μ sec の直流電流を 1 回付与し、融合処理を行った。その後、IVC-PyrLac で 3 回洗浄を行った後、細胞質小片が融合するまで 1 時間培養を行った。1 時間後に、実体顕微鏡下で観察を行ない、融合が確認された卵を核置換卵として選別して実験に供試した。同様に屠場卵巣由来のブタ成熟卵からを用いて作出した核置換卵を対照区として実験に供試した。

<Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵を用いた核置換卵の単為発生能の評価>

融合刺激後の融合が確認された核置換卵は、0.8 kV/cm for 30 μ sec の条件にて直流電流を 2 回付与し、単為発生刺激を付与した。電気刺激後、対照区および核置換区の核置換卵は、IVC-PyrLac に 5 μ g/ml の CB を添加した培地で 2 時間培養を行い、第二極体放出の抑制を行った。2 時間後、IVC-PyrLac にて 3 回洗浄後、WOW system を用いて IVC を行った[Vajta *et al.*, 2000]。単為発生刺激を行なった日を Day 0 とし、Day 0 から Day 2 までは IVC-PyrLac にて、Day 2 から Day 7 までは IVC-Glu + 5%(v/v)FCS を用いて IVC を行なった。IVC 開始 7 日目に既報により固定・染色を行い、位相差顕微鏡下で観察後、胚盤胞腔が確認され、胚盤胞細胞数が 10 個以上観察された胚を胚

盤胞として対照区および核置換区の胚盤胞形成率およびその細胞数の観察を行なった。

<実験計画>

本研究において、Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵と屠場卵巣由来のブタ成熟卵を核置換することで作出した核置換卵の単為発生誘起処理後の単為発生能および胚盤胞細胞数に及ぼす影響を調べるため、以下の試験区を設定した。

対照区 (K + 2 C) 屠場卵巣由来の成熟卵から作出した Karyoplast 1 つおよび
Cytoplast を 2 つ融合させ、作出した核置換卵

対照区 (K + 3 C) 屠場卵巣由来の成熟卵から作出した Karyoplast を 1 つと、
Cytoplast を 3 つ融合させ、作出した核置換卵

Xeno-K + 2 C 区: Xenograft 卵巣由来の成熟卵から作出した Karyoplast を 1 つと、
Cytoplast を 2 つ融合させ、作出した核置換卵

Xeno-K + 3 C 区: Xenograft 卵巣由来の成熟卵から作出した Karyoplast 1 つと、
Cytoplast を 3 つ融合させ、作出した核置換卵

実験 2: Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵を用いた細胞質添加

<Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵を用いた細胞質添加卵の作出>

Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵への細胞質添加の手法は第 3 章の方法と同様に行った。Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵の透明帯を除去した後に、屠場卵巣由来の成熟卵より作出した Cytoplast を 3 つ、ヘマグルチニン中にて接着させた。その後、融合・活性化液であるマンニトールと TCM-199 を混合して、段階的に核置換卵を洗浄し

た。細胞融合用チャンバーに約 300 μ l の活性化液と共に核置換卵を移した。その後、チャンバーを細胞融合装置に接続し、融合処理を行った。その後、IVC-PyrLac で 3 回洗浄を行った後、細胞質小片が融合するまで 1 時間培養を行った。1 時間後に、実体顕微鏡下で観察を行ない、融合が確認された卵を細胞質添加卵として選別して実験に供試した。

<Xenograft 卵巣由来の成熟卵を用いた細胞質添加卵の単為発生能の評価>

Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵に屠場卵巣由来の成熟卵の細胞質小片を添加することで作出した。細胞質添加卵および対照区の卵に電気刺激を付与することで、単為発生能の評価を行った。実験 1 の方法と同様に電気刺激を付与することで、単為発生誘起処理を行った。その後、7 日間 IVC を行った。IVC 開始 7 日目に既報により固定/染色を行い、位相差顕微鏡下で観察後、胚盤胞腔が確認され、胚盤胞細胞数が 10 個以上観察された胚を胚盤胞として、対照区および細胞質添加区の胚盤胞形成率およびその細胞数の観察を行なった。

<Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵を用いた細胞質添加卵の IVF および IVC>

Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵に屠場卵巣由来の成熟卵の細胞質を添加することで作出した、細胞質添加卵および対照区の卵は第 3 章と同様に IVF を行い、WOW system により 7 日間 IVC を行った。IVC 開始 7 日目に既報により固定・染色を行い、位相差顕微鏡下で観察後、胚盤胞腔が確認され、胚盤胞細胞数が 10 個以上観察された胚を胚盤胞として、対照区および細胞質添加区の胚盤胞形成率およびその細胞数の観察を行なった。

<実験計画>

本研究において、Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵へ屠場卵巣由来のブタ成熟卵から作出した Cytoplasm を融合させること作出した細胞質添加卵の単為発生誘起処理および IVF 後の胚盤胞への発生能および胚盤胞細胞数に及ぼす影響を調べるため、以下の試験区を設定した

対照区(O)	屠場卵巣由来の成熟卵の透明帯を除去し、細胞融合刺激を付与した区。
対照区(O + 3 C)	屠場卵巣由来の成熟卵の透明帯を除去し、屠場卵巣由来の成熟卵から作出した cytoplasm(C)を 3 つ融合させた区。
試験区(Xeno-O + 3 C)	Xenograft 卵巣由来の成熟卵の透明帯を除去し、屠場卵巣由来の成熟卵から作出した cytoplasm(C)を 3 つ融合させた区。

<統計処理>

統計処理は第 1 章と同様の方法で行った。対照区および各細胞質添加区の卵の単為発生誘起処理および IVF 後の胚盤胞への発生率はアークサイン変換を行なった。その後、胚盤胞の細胞数を加えた全ての結果は、SAS の GLM を使用した一元配置の分散分析を行い、解析モデルに有意差が認められた場合、引き続きダンカンの多重比較検定を行った。

【結果】

実験 1: Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵を用いた核置換

<単為発生誘起処理後の胚盤胞への発生能>

Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵を用いて、屠場卵巣由来の成熟卵の Cytoplasm と核置換を行うことで作出した、核置換卵の単為発生能を調べた結果を Table 12 に示した。その結果、対照区(K + 2 C および K + 3 C)ではそれぞれ、4.5%、4.5%であった。また、Xeno-K + 2 C 区においては胚盤胞への発生は認められなかったが、Xeno-K + 3 C 区においてその発生率は 6.3%であった。単為発生誘起処理後の胚盤胞への発生率およびその細胞数において、各試験区間に有意な差は認められなかった。

実験 2: Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵を用いた細胞質添加

<単為発生誘起処理後の胚盤胞への発生能>

対照区(O、O + 3 C)および細胞質添加区(Xeno-O + 3 C)の単為発生誘起処理後の胚盤胞への発生率およびその細胞数を Table 13 に示した。単為発生能を調べた結果、対照区(O)は 3.6%、対照区(O + 3 C)は 18.0%であった。また、試験区(Xeno-O + 3 C)の胚盤胞への発生率は 24.8%であった。各対照区(O および O + 3 C)と試験区(Xeno-O + 3 C)区間において、胚盤胞への発生率には有意な差は認められなかった。また、得られた胚盤胞の細胞数を観察した結果、対照区(O; 17.2 個)、対照区(O + 3 C; 42.8 個)および試験区(Xeno-O + 3 C; 49.3 個)であり、対照区および試験区間に有意な差は認められなかった。

<IVF/IVC 後の胚盤胞への発生能>

対照区(O、O + 3 C)および Xeno-O + 3 C の IVF/IVC 後の胚盤胞への発生率およびその細胞数を Table 14 に示した。IVF 後の胚盤胞への発生能を調べた結果、対照区(O)、

対照区(O + 3 C)は、それぞれ 13.3%、19.9%であった。また、Xeno-O + 3 C では、16.1% となり、各試験区間に有意な差は認められなかった。また、得られた胚盤胞の細胞数を観察した結果、対照区(O; 25.4 個)、対照区(O + 3 C; 39.9 個)および試験区(Xeno-O + 3 C; 32.5 個)において、各試験区間に有意な差は認められなかった。

【考察】

本章では、核置換および細胞質添加技術を用いた胚発生能改善に関する研究の1例として、Xenograft卵巣由来のブタ成熟卵の細胞質成熟を改善することを試みた。

Xenograftに関する研究以外では、人為的な細胞質成熟の改善、言い換えれば核置換等の顕微操作を行い、胚発生率の改善が、マウスなどによって報告されている。Liu *et al.*(2003)は、胚盤胞への発生能が低いと考えられるマウス体外成熟卵の核を、細胞質成熟が十分であると考えられる*in vivo*由来の除核した成熟卵へと核置換を行うことで、単為発生誘起処理後の胚盤胞への発生能を改善することを報告している。

これまで、ヒトでは、加齢と共に卵自体も老化し不妊になることが報告されている[Society for Assisted Reproductive Technology, American Society for Reproductive Medicine. 1995、 Keefe. 1998]。マウスにおいて老化した卵の核の遺伝情報を維持する手法においても核置換は利用されており、Bai *et al.*(2006)はマウス卵において、胚盤胞への発生能が低い、排卵42時間後のM-II期卵に含まれる核を排卵直後の除核されたM-II期卵の細胞質へと核置換することで、単為発生およびIVF後の胚盤胞への発生を維持できることを報告している。以上、これらの報告および本研究の結果より、加齢卵においてはIVF後の胚盤胞への発生には卵の細胞質の要因が大変重要であることが考えられる。

加齢卵とともに低い細胞質成熟度の卵が得られる例として、Xenograft卵巣由来のブ

タ卵がある[Kaneko *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2006]。マウスの腎皮膜下へ、Xenograftしたブタ卵巢では、卵胞の発育ならびに、その卵胞に含まれる卵の発育はマウス生体内において進行する。十分に発育した未成熟卵を採卵しても、通常のブタ未成熟卵と比較して、mRNAなどの母性因子の量やミトコンドリアなどの細胞小器官の形成に異常が生じるため、IVM後の成熟卵の細胞質成熟が不十分となり、胚盤胞まで発生しないと考えられる。そのような卵に含まれる遺伝情報を維持する手法として、屠場卵巢由来のブタ成熟卵の細胞質への核置換およびそのCytoplasmを利用した細胞質添加が有効であることが示唆された。

本研究においては、細胞質成熟が不十分であると考えられる、Xenograft卵巢由来のブタ成熟卵の核と、屠場卵巢由来の成熟卵の細胞質との核置換を行った。作出した核置換卵の単為発生誘起処理後の胚盤胞への発生においても、屠場卵巢由来のブタ成熟卵を用いた対照区では8.3%、Xenograft卵巢由来のブタ成熟卵を用いた核置換卵では6.3%となり、有意な差は認められず、同様の結果が得られた。

これまで、Xenograft卵巢由来のブタ成熟卵はIVF後のMPN形成能を有していることが報告されている[Kaneko *et al.*, 2003]。また、Kikuchi *et al.*(2006)の報告においてもXenograft卵巢由来のブタ成熟卵のIVF/IVC後の胚盤胞への発生率は低い(1%以下)ことが報告されている。このように、Xenograft卵巢由来のブタ成熟卵のIVF/IVC後の胚盤胞への発生率が低い原因として、細胞質成熟が不十分であることが考えられる。本研究において、Xenograft卵巢由来のブタ成熟卵と屠場卵巢由来の成熟卵のCytoplasmを3つ融合することで作出した細胞質添加卵においても単為発生誘起処理後の単為発生率は24.8%、また、IVF/IVC後の胚盤胞への発生率は21.6%となり、それぞれ胚盤胞への発生能を有しており、IVFの結果においては、これまで報告されていた胚盤胞への発生能を改善することに成功した。

Liu *et al.*(2003)、Bai *et al.*(2006)ならびに本研究の結果より、単為発生誘起処理およ

びIVF後の胚盤胞の発生には成熟卵の核の要因に加え、細胞質の要因が重要であることが示唆された。また、細胞質成熟が不十分な卵の胚盤胞への発生能を改善する改善する手法として、十分に細胞質成熟が進行したと考えられる屠場卵巢由来のブタ成熟卵の細胞質小片との核置換、もしくは細胞質添加技術を適応することが有効であることが示唆された。

さらに、今後の展開として、IVF後の大幅な胚発生能の改善が認められた、Xenograft卵巢由来のブタ成熟卵へ細胞質小片の添加により作出した、細胞質添加卵の仮親への胚移植を行うことで、産子への発生能を評価する必要がある。

総合考察

本研究は、ブタ卵の核置換法を確立することを目的として行った。核置換を行う卵のステージとして、減数分裂が静止している GV 期もしくは M-II 期の卵を用いて行うことが望ましいと考えられる。しかし、核置換には顕微操作により行うことが一般的であり、顕微操作を行う際には卵から卵丘細胞を除去する必要がある。ブタでは GV 期に卵から卵丘細胞を裸化させると卵の核および細胞質成熟に影響を及ぼすことが考えられる。そこで、本研究の第 1 章においては、マウスやウサギで行われている GV 期核置換を実施することを前提にして、核置換には必須である GV 期における卵丘細胞の剥離が、ブタ卵のその後の核成熟、さらに IVF 後の受精および IVC 後の胚盤胞への発生に及ぼす影響を調べた。さらに、IVF 後の精子頭部の脱凝縮や MPN 形成に重要な役割を果たすことが報告されている成熟卵細胞質内 GSH 量[Yoshida *et al.*, 1993]を測定した。GSH 量は細胞質成熟の指標の 1 つとされており、この指標とブタ卵の受精能および胚発生能との相関を調べた。その結果、GV 期卵の卵丘細胞裸化は、卵の成熟率、成熟卵細胞質内 GSH 量、成熟卵細胞質内 GSH 量、IVF 後の MPN 形成率および IVC 後の胚盤胞への発生率とその細胞数を減少させた。このことから、卵に付着する卵丘細胞が卵の成熟、受精および胚発生に重要な役割を有していることが示唆された。また、成熟卵細胞質内 GSH 量と MPN 形成率、胚盤胞への発生およびその細胞数と相関を調べたところ、強い正の相関が認められた。IVF/IVC 後の胚盤胞への発生は細胞質成熟の指標の 1 つである。そのため、成熟卵細胞質内 GSH 量と胚盤胞への発生能に強い正の相関が認められたことは、成熟卵細胞質内 GSH 量がブタ卵の IVF/IVC 後の受精および胚盤胞への発生に重要な要因の 1 つであることが示唆された。また、成熟卵細胞質内 GSH 量は IVM 時に卵に付着する卵丘細胞によって制御されていることが示唆された。これまで、成熟卵細胞質内 GSH 量を測定することでブタ卵の細胞質成熟を生化学的に評価し、GSH 量と MPN 形成および胚盤胞への発生

との相関を調べた研究は報告されておらず、本研究が初めての報告となった [Maedomari *et al.*, 2007]。GSH はシステイン、グルタミン酸およびグリシンから卵丘細胞内にて合成され、合成された GSH は Gap junction を介して卵細胞質内に蓄積されることが知られている [Nagai. 2001]。GSH には、精子や卵を酸化物質から保護する、抗酸化作用を有することも知られている。IVM では体外で成熟培養を行うため、通常の培養状態では卵を体内より高い酸素濃度下にて培養することになる。高い酸素濃度下では酸化物質が産生されやすい。そのため、卵細胞質内 GSH がそれらの酸化物質から卵細胞を保護するために使用されることが考えられる。このように、ブタ卵を GV 期において卵丘細胞を裸化することは、卵の成熟、受精および胚発生率および成熟卵細胞質内 GSH 量を低減させるため、GV 期における核置換は、その後の成熟卵、受精および胚盤胞への発生という観点から実質上困難であると結論づけられた。

そこで、第2章では卵丘細胞の影響を受けないM-II期の卵を用いて核置換を試みた。通常、核置換には顕微操作により、除核や核の注入操作を行う必要がある。しかし、このような顕微操作には、技術習得や装置の設置などの多くの問題がある。そこで、Fahrudin *et al.*(2007)がブタ卵の核移植胚作出法として考案した簡易的手法である、Centri-Fusion法を応用してブタM-II期卵の核置換を行った。また、ブタやウシにおいて核移植胚では、除核時に除去した細胞質量と同量の細胞質を添加することで分割率および胚発生率は上昇することが報告されている。[Greising *et al.*, 1994]。また、ブタ核移植胚においてもレシピエント細胞質量の増加は胚発生能を改善することが報告されている [Fahrudin *et al.*, 2007]。本研究において、ブタのM-II期における核置換卵の胚発生においても同様に、核置換卵の細胞質量の増加は胚発生能を改善することが明らかとなった。。一方で、Westhusin *et al.*(1996)はウシ核移植胚の胚盤胞への発生率には細胞質量は影響しないことを報告している。しかし、その報告では、胚盤胞の細胞数において、細胞質量を50%減少させた核移植胚から発生した胚盤胞の細胞数は、細

胞質量を5%減少させた核移植胚よりも少なくなることが報告されており、胚の品質には細胞質量が影響を及ぼすことを見出している。また、マウスにおいて細胞質量はIVF後の胚盤胞への発生に影響しないことも報告されている[Wakayama and Yanagimachi, 1998]。さらに、マウス成熟卵の細胞質量を増加させてICSIを行った結果、胚発生率には影響しないことも報告されている[Wakayama *et al.*, 2004]。このように胚発生において卵の細胞質量の影響には、種差があることが考えられる。

卵の細胞質にはミトコンドリア、mRNA、GSHなどの胚発生に必要な様々な物質が含まれている。本研究においてブタ核置換卵の胚発生率が細胞質量を増加させることで改善された原因の1つとして、添加した細胞質小片中にそれらの物質が含まれていたため、細胞質小片を融合させることでmRNA、GSHなどの胚発生に必要な様々な物質の量が増加したためであると考えられる。El Shourbagy *et al.*(2006)は、ブタ体外成熟卵において細胞質内のミトコンドリアDNA(mtDNA)のコピー数が多い成熟卵は、mtDNAが少ない卵に比べてIVF後の受精能が高いことを報告している。また、このmtDNAの欠如は、卵の質と胚盤胞への発生率の低下との相関があることが知られている[Gibson *et al.*, 2005]。ミトコンドリアの機能の1つにadenosine triphosphase(ATP)の産生がある。ATPは卵の減数分裂の再開および卵の活性化、受精や胚発生において必要とされており事実、卵細胞質内ATP量が減少することで胚発生が遅延することや胚盤胞の細胞数が減少することがヒトにおいて報告されている[Blerkom *et al.*, 1995]。これらの報告からも、核置換卵の細胞質量の増加は、胚発生能に重要であることが明らかであることが示唆された。

本研究の第3章においてCentri-Fusion法を応用したブタ成熟卵の核置換を行い作出した核置換卵は胚盤胞への発生することが認められた。しかし、成熟卵と同様の大きさであるK+2C区では胚盤胞への発生率は対照区と比較して有意に低い値を示した。Centri-Fusion法による核置換卵の作出過程において、核を可視化するためにヘキスト

染色後、細胞質小片に UV 照射を行う必要があり、この UV 照射が核置換卵の胚盤胞への発生能を低下させている可能性がある。これまで、ウシの成熟卵の M-II 期の核に UV を照射することで単為発生刺激後に異常が生じること、M 期(卵成熟)促進因子活性の低下が制御されてしまうこと、さらには IVF 後の雌性前核形成において染色体の凝集などの異常が認められることが知られている[Bradshaw *et al.*, 1995]。また、第 2 章においてブタ核置換卵の胚盤胞への胚発生には細胞質量が重要であることが示唆されたため、本章では、M-II 期核への UV 照射を回避し、細胞質量を増加させる手法として、成熟卵へ細胞質を添加する手法を考案した。その結果、細胞質を添加した細胞質添加卵は IVF 後の胚盤胞への発生が認められた。また、対照区である成熟卵と比較してその発生率は有意に増加した。すなわち、卵へ添加する細胞質小片は、胚盤胞への発生を支持する能力を有していることが、本研究および Fahrudin *et al.*(2007)の報告から明らかとなり、細胞質添加卵の作出のための細胞質小片の添加は、卵の胚盤胞への発生能を改善させるための有効な手法であることが示唆された。

これまで、核置換もしくは細胞質添加によるブタ成熟卵の胚盤胞への発生能の改善に関して検討してきた。その結果、パーコールの密度勾配を利用した遠心処理後に得られた細胞質小片には胚盤胞への発生を支持する能力を有しており、さらに、その細胞質小片を融合させて細胞質量を増加させることが、ブタ卵の胚発生を改善する技術であることが明らかとなった。本研究の第 4 章では、この技術を胚盤胞への発生能の低いブタ卵へ応用することで、発生能の低いブタ卵から効率よく胚盤胞を作出することが可能となるかどうかについて検討した。これまで、Kaneko *et al.*(2003)の開発したブタ卵巢の Xenograft は新たな遺伝資源の保存法として期待される。しかし、Xenograft 卵巢由来の成熟卵は胚盤胞への発生能が低いことが提案されている [Kikuchi *et al.*, 2006]。ブタ卵巢の Xenograft と核置換もしくは細胞質添加を組み合わせることで、Xenograft 卵巢由来の成熟卵の胚盤胞への発生能を改善させることが予想され、この

技術は新たな遺伝資源の保全技術として期待される。実際に Xenograft 卵巣由来の成熟卵を用いて核置換卵および細胞質添加卵を作出し、IVF 後の胚盤胞への発生能を調べた結果、核置換卵および細胞質添加卵において、単為発生および IVF 後の胚盤胞へ発生能を有していることが明らかとなった。これまで、Xenograft 卵巣由来の成熟卵の IVF 後の胚盤胞への発生率は 1%以下と低率であった。しかし、本章において Xenograft 卵巣由来の成熟卵を用いた核置換卵の単為発生率は 6.3%、細胞質添加卵においては 24.8%となり、Xenograft 卵巣由来の成熟卵の発生能が改善された。さらに、細胞質添加卵の IVF 後の胚盤胞への発生能を調べた結果、21.6%となり、Kaneko *et al.*(2006)の報告した胚盤胞への発生率を大幅に改善させることに成功した。

このように核置換は細胞質成熟が不十分な卵に含まれる遺伝情報を維持するために重要な技術であることが示唆され、さらに、成熟卵への細胞質添加も同様に遺伝資源を保全するための有効な技術であることが示唆された。また、本研究において、ブタ核置換卵および細胞質添加卵の胚発生には細胞質量が重要であることが明らかになった。この知見は、ブタの生殖工学技術の発展に大きく貢献するものであると考えられる。また、核置換および細胞質添加技術は今後、さらなる卵の胚発生メカニズム解明、およびヒトの不妊治療の分野への応用が期待される技術であることが考えられる。

参考文献

- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN. Glutathione content and embryo development after *in vitro* fertilisation of pig oocytes matured in the presence of a thiol compound and various concentrations of cysteine. *Zygote* 1999; 7; 203-210.
- Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. In: Meister A., editor, *Glutamate, Glutamine, Glutathione, and Related Compounds*, New York: Academic Press 1985; 548-555.
- Antczak M and Blerkom JV. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol. Hum. Reprod.* 1997; 3; 1067-1086
- Bao S, Ushijima H, Hirose A, Aono F, Ono Y, Kono T. Development of bovine oocytes reconstructed with a nucleus from growing stage oocytes after fertilization *in vitro*. *Theriogenology* 2003; 59; 1231-1239.
- Bing YZ, Hirao Y, Iga K, Che LM, Takenouchi N, Kuwayama M, Fuchimoto D, Rodriguez-Martinez H, Nagai T. *In vitro* maturation and glutathione synthesis of porcine oocytes in the presence or absence of cysteamine under different oxygen tensions: role of cumulus cells. *Reprod. Fertil. Dev.* 2002; 14; 125-131.
- Binor Z, Wolf DP. *In vitro* maturation and penetration of mouse primary oocytes after removal of the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 1979; 56; 309-314.
- Bordignon V and Smith C. Lawrence. Ultraviolet-Irradiated Spermatozoa Activate Oocytes but Arrest Preimplantation Development After Fertilization and Nuclear Transplantation in Cattle. *Biol. Reprod. Dev.* 1999; 61; 1513-1520

- Bradshaw J, Jung T, Fulka J. JR and Moor RM. UV Irradiation of chromosomal DNA and its effect upon MPF and meiosis in mammalian oocytes. Mol. Reprod. Dev. 1995; 41; 503-512.
- Calvin HI, Grosshans K, Blake EJ. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepubertal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. Gamete Res. 1986; 14; 265-275.
- Campo G.M., Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Ferlazzo AM, Calatroni A. Reduction of DNA fragmentation and hydroxyl radical production by hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate in iron plus ascorbate-induced oxidative stress in fibroblast cultures. Free Radic. Res. 2004b; 38; 601-611.
- Campo G.M., D'Ascola A, Avenoso A, Campo S, Ferlazzo AM, Micali C, Zanghi L, Calatroni A. Glycosaminoglycans reduce oxidative damage induced by copper (Cu^{+2}), iron (Fe^{+2}) and hydrogen peroxide (H_2O_2) in human fibroblast cultures. Glycoconj. J. 2004a; 20; 133-141.
- de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Baldassarre H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 1995; 42; 32-36.
- de Matos DG, Furnus CC, Moses DF. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. Biol. Reprod. 1997; 57; 1420-1425.
- de Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione(GSH)level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. Theriogenology 2000; 53; 761-771.
- El Shourbagy SH, Spikings EC, Freitas M and St John JC. Mitochondria directly

- influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction* 2006; 131; 233-245
- Eppig JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996; 8; 485-489.
 - Fahrudin M, Kikuchi K, Karja NW Kurniani, Ozawa M, Maedomari N, Somfai T, Ohnuma K, Noguchi J, Kaneko H, and Nagai T. Development to the blastocyst stage of porcine somatic cell nuclear transfer embryos reconstructed by the fusion of cumulus cells and cytoplasts prepared by gradient centrifugation. *Cloning and Stem Cells* 2007; 9; 216-228
 - Fatehi AN, Roelen BA, Colenbrander B, Schoevers EJ, Gadella BM, Beverst MM, van den Hurk R. Presence of cumulus cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. *Zygote* 2005; 13; 177-185.
 - Funahashi H, Stumpf TT, Cantley TC, Kim NH, Day BN. Pronuclear formation and intracellular glutathione content of *in vitro*-matured porcine oocytes following *in vitro* fertilisation and/or electrical activation. *Zygote* 1995; 3; 273-281.
 - Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T. Normal calves were born from blastocysts obtained from cumulus-free bovine oocytes matured in serum-free medium supplemented with sodium pyruvate. *Biol. Reprod.* 2000; 63; 1730-1 734.
 - Hui Liu, Chang Hung Chi, Zhang John, Grifo Jamie and Kery C. Lewis. Metaphase II nuclei generated by germinal vesicle transfer in mouse oocytes support embryonic development to term. *Hum. Reprod.* 2003; 18; 1903-1907
 - Hunter MG. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction* 2000; 5; 122-130.
 - Isobe N, Maeda T, Terada T. Involvement of meiotic resumption in the disruption of

- gap junctions between cumulus cells attached to pig oocytes. J. Reprod. Fertil. 1998; 113; 167-72.
- Kaneko H, Kikuchi K, Noguchi J, Hosoe M, and Akita T. Maturation and fertilization of porcine oocytes from primordial follicles by a combination of xenografting and *in vitro* culture. Biol. Reprod. 2003; 69; 1488-1493
 - Kaneko H, Kikuchi K, Noguchi J, Ozawa M, Ohnuma K, Maedomari N, and Kashiwazaki N. Effects of gonadotrophin treatments on meiotic and developmental competence of oocytes in porcine primordial follicles following Xenografting to nude mice. Reproduction 2006; 131; 1470-1626
 - Kaneko H, Nakanishi Y, Akagi S, Arai K, Taya K, Watanabe, Sasamoto S, Hasegawa Y. Immunoneutralization of inhibin and estradiol during the follicular phase of the estrous cycle in cows. Biol. Reprod. 1995; 53; 931-939.
 - Kaneko H, Todoroki J, Noguchi J, Kikuchi K, Mizoshita K, Kubota C, Yamakuchi H. Perturbation of estradiol-feedback control of luteinizing hormone secretion by immunoneutralization induces development of follicular cysts in cattle. Biol. Reprod. 2002; 67; 1840-1845.
 - Keefe DL. Reproductive aging is an evolutionarily programmed strategy that no longer provides adaptive value. Fertil. Steril. 1998; 70; 204-206
 - Kikuchi K, Kaneko H, Nakai M, Noguchi J, Ozawa M, Ohnuma K and Kashiwazaki N. *In vitro* and *in vivo* developmental ability of porcine oocytes derived from porcine primordial follicles xenografted into nude mice. J. Reprod. Dev. 2006; 52; 51-57
 - Kikuchi K, Kashiwazaki N, Noguchi J, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, Shino M, Ueda M and Kaneko H. Developmental competence, after transfer to

- recipients, of porcine oocytes. matured, fertilized, and cultured *in vitro*. Biol. Reprod. 1999; 60; 336-340.
- Kikuchi K, Nagai T, Kashiwazaki N, Ikeda H, Noguchi J, E Soloy and H. Kaneko. Cryopreservation and ensuing *in vitro* fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. Theriogenology 1998; 50; 615-623
 - Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T, Nagai T. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. Biol. Reprod. 2002; 66; 1033-1041.
 - Kim KS, Minami N, Yamada M, Utsumi K. Follicular cells affect the fertilizability and developmental competency of bovine oocytes *in vitro*. Reprod. Fertil. Dev. 1997; 9; 763-766.
 - Li G.P., Chen DY, Li L, Sun QY, Wang MK, Liu JL, Li JS and Han ZM. Viable rabbits derived from reconstructed oocytes by germinal vesicle transfer after intracytoplasmic sperm injection(ICSI). Mol. Reprod. Dev. 2001c; 58; 180-185.
 - Li GP, Chen DY, Lian L, Sun QY, Wang MK, Song XF, Meng L, Schatten H. Mouse-rabbit germinal vesicle transfer reveals that factors regulating oocyte meiotic progression are not species-specific in mammals. J. Exp. Zool. 2001a; 289; 322-329
 - Li GP, Lian L, Wang MK, Lian Y and Chen DY. Maturation of the reconstructed oocytes by germinal vesicle transfer in rabbits and mice. Theriogenology 2001b; 56; 855-866
 - Liu H, Chang HC, Zhang J, Grifo J, Krey LC. Metaphase II nuclei generated by germinal vesicle transfer in mouse oocytes support embryonic development to term. Hum. Reprod. 2003; 18; 1903-1907.
 - Liu H, Wang CW, Grifo JA, Krey LC, Zhang J. Reconstruction of mouse oocytes by

germinal vesicle transfer: maturity of host oocyte cytoplasm determines meiosis. Hum. Reprod. 1999; 14; 2357-2361.

- Liu J, der Elst JV, and Dhont M. *In vitro* parthenogenetic development of mouse oocytes following reciprocal transfer of the chromosome spindle between *in vivo*-matured oocytes and *in vitro*-matured oocytes. Biol. Reprod. 2003; 68; 186-189
- Lubberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. Reprod. Biol. 2005; 5; 5-17.
- Luciano AM, Lodde V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A and Modina S. Developmental capability of denuded Bbovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 30, 50-monophosphate, and glutathione. Mol. Reprod. Dev. 2005; 71; 389-397.
- Maedomari N, Kikuchi K, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Nakai M, Shino M, Nagai T and Kashiwazaki N. Cytoplasmic glutathione regulated by cumulus cells during porcine oocyte maturation affects fertilization and embryonic development *in vitro*. Theriogenology 2007; 67; 983-993.
- Magnusson C. Role of cumulus cells for rat oocyte maturation and metabolism. Gamete Res. 1980; 3; 133-140.
- Marchal R, Feuqang JM, Perreau C, Venturi E, Terqui M and Mermillod P. Meiotic and Developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. Theriogenology 2001; 56; 17-29
- Mattioli M, Galeati G, Seren E. Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. Gamete Res. 1988; 20; 177-183.
- Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. Science 1983; 220;

- Moffa F, Comoglio F, Krey LC, Grifo JA, Revelli A, Massobrio M, Zhang J. Germinal vesicle transfer between fresh and cryopreserved immature mouse oocytes. Hum. Reprod. 2002; 17; 178-83.
- Mori T, Amano T, Shimizu H. Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured *in vitro*. Biol. Reprod. 2000; 62; 913-919.
- Motlik J, Fulka J, Flechon JE. Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation *in vivo* and *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 1986; 76; 31-37.
- Nagai T, Geshi M, Yonai M and Yamauchi N. *In vitro* fertilization and subsequent development of denuded porcine oocytes matured *in vitro*. Theriogenology 1998; 49; 294
- Nagai T, Takahashi T, Masuda H, Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S, Hanada A. *In vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 1988; 84; 585-591.
- Nagai T, Yamauchi N, Geshi M. Cumulus cells function during porcine and bovine oocyte maturation *in vitro*. In: Roberts RM., Yanagimachi R., Kariya T., Hashizume K., editors. Cloned Animal and Placenta, Tokyo: Yokendo; 2000; 548-555.
- Nagai T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. Theriogenology 2001; 55; 1291-1301.
- Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Shino M and Kikuchi K. Morphologic changes in boar sperm nuclei with reduced disulfide bonds in electrostimulated porcine oocytes. Reproduction 2006;

131; 603-611

- Nishi Y, Takeshita T, Sato K, Araki T. Change of the mitochondrial distribution in mouse ooplasm during *in vitro* maturation. J. Nippon Med. Sch 2003; 70; 408-415.
- Ozawa M, Hirabayashi M, Kanai Y. Developmental competence and oxidative state of murine zygotes heat stressed maternally or *in vitro*. Reproduction 2002; 124; 683-689.
- Perreault SD, Barbee RR, Slott VL. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. Dev. Biol. 1988; 125; 181-186.
- Petters RM, Wells KD. Culture of pig embryo. J.Reprod. Suppl. 1993; 48; 61-73
- Peura TT and Vajta G. A comparison of established and new approaches in ovine and bovine nuclear transfer. Cloning and Stem Cells 2003; 5; 257-277.
- Peura TT, Lewis IM, and Trounson AO. The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. Mol. Reprod. Dev. 1998; 50; 185-191
- Snedecor GW, Cochran WG. In: Statistical Methods. 8th ed., Ames: The Iowa State University Press; 1989; 273-296.
- Society for Assisted Reproductive Technology, American Society for Reproductive Medicine. Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1992 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology registry. Fertil. Steril. 1995; 64; 13-21.
- Somfai T, Kikuchi K, Onishi A, Iwamoto M, Fuchimoto D, Papp AB, Sato E, Nagai T. Relationship between the morphological changes of somatic compartment and the kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes during *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes. Mol. Reprod. Dev. 2004; 68; 484-491.

- Staigmiller RB, Moor RM. Effect of follicle cells on the maturation and developmental of ovine oocytes matured outside the follicle. Gamete Res. 1984; 9; 221-229
- Suzuki K, Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodrigues-Martinez H. Capacitation status and *in vitro* fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. Int. J. Androl. 2002; 25; 84-93.
- Tatemoto H, Okuda T, Sogo N and Muto N. Male pronuclear formation and blastocyst formation are improved by supplementation of ascorbic acid 2-o- α -glucoside during *in vitro* maturation culture of denuded porcine oocytes. J. Reprod. Dev. 2001; 47; 329-339.
- Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of cumulus cells. Biol. Reprod. 2000; 63: 805-810.
- Tecirlioglu RT, Cooney MA, Lewis IM, Korfiatis NA, Hodgson R, Ruddock NT, Vajta G, Downie S, Trounson AO, Holland MK and French AJ. Comparison of two approaches to nuclear transfer in the bovine: hand-made cloning with modifications and the conventional nuclear transfer technique. Reprod. Fertil. Dev. 2005; 17; 573-585.
- Vajta G, Peura TT, Holm P, Paldi A, Greve T, Trounson AO and Callesen H. New Method for Culture of Zona-Included or Zona-Free Embryos: The Well of the Well (WOW) System. Mol. Reprod. Dev. 2000; 55; 256-264.
- Wakayama S, Kishigami S, Nguyen V Thuan, Ohta H, Hikichi T, Mizutani E, Miyake M and Wakayama T. Fertilizability and developmental ability of mouse

artificial giant oocytes. Asian Reproductive Biotechnology 第1回大会講演要旨
2004; 58-60

- Wakayama T and Yanagimachi R. Fertilisability and developmental ability of mouse oocytes with reduced amounts of cytoplasm. Zygote 1998; 6; 341-346
- Wongsrikeao P, Kaneshige Y, Ooki R, Taniguchi M, Agung B, Nii M, Otoi T. Effect of the removal of cumulus cells on the nuclear maturation, fertilization and development of porcine oocytes. Reprod. Dom. Anim. 2005; 40; 166-170.
- Wu B, Tong J, Leibo S.P., Effects of cooling germinal vesicle-stage bovine oocytes on meiotic spindle formation following *in vitro* maturation. Mol. Reprod. Dev. 1999; 54; 388-395.
- Yamauchi N and Nagai T. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine. Biol. Reprod. 1999; 61; 828-833.
- Yokoo M, Sato E. Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. Int. Rev. Cytol. 2004; 235; 251-291.
- Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel VG. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. Biol. Reprod. 1993b; 49; 89-94.
- Yoshida M. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 1993a; 35; 76-81
- Zhang J, Wang CW, Krey L, Liu H, Meng L, Blaszczyk A, Adler A and Grifo J. *In vitro* maturation of human preovulatory oocytes reconstructed by germinal vesicle transfer. Fertil. Steril. 1999; 71; 726-731.
- Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA. Cumulus cell function during

bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 1995; 40; 338-344

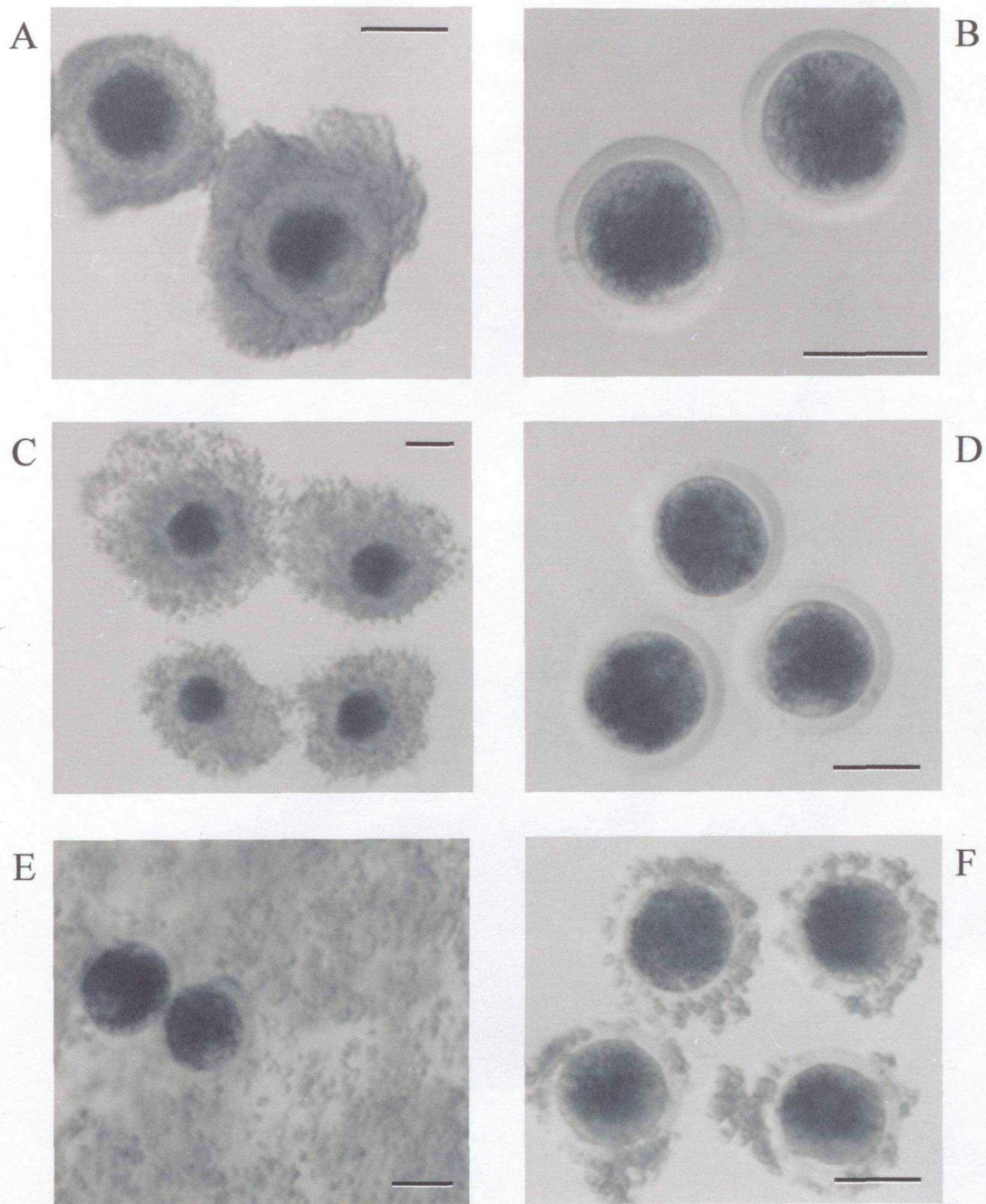


Fig. 1 実験に供したブタ卵と卵丘細胞の状態

(Bar = 100 μ m)

- A. 屠場卵巣から回収した直後の卵丘細胞-卵複合体(COCs)
- B. 採卵直後に卵丘細胞を除去した卵(DO 0 h 区)
- C. IVM 開始 24 時間後の COCs
- D. IVM 開始 24 時間後に COCs から卵丘細胞を完全に除去した卵(DO 24 h 区)
- E. IVM 開始 24 時間後に卵丘細胞を完全に除去し、IVM 開始直前に除去した卵丘細胞と共培養を行った卵(DO 24 h + CC 区)
- F. IVM 開始 24 時間後に卵丘細胞を部分的に除去した卵(H-DO 24 h 区)

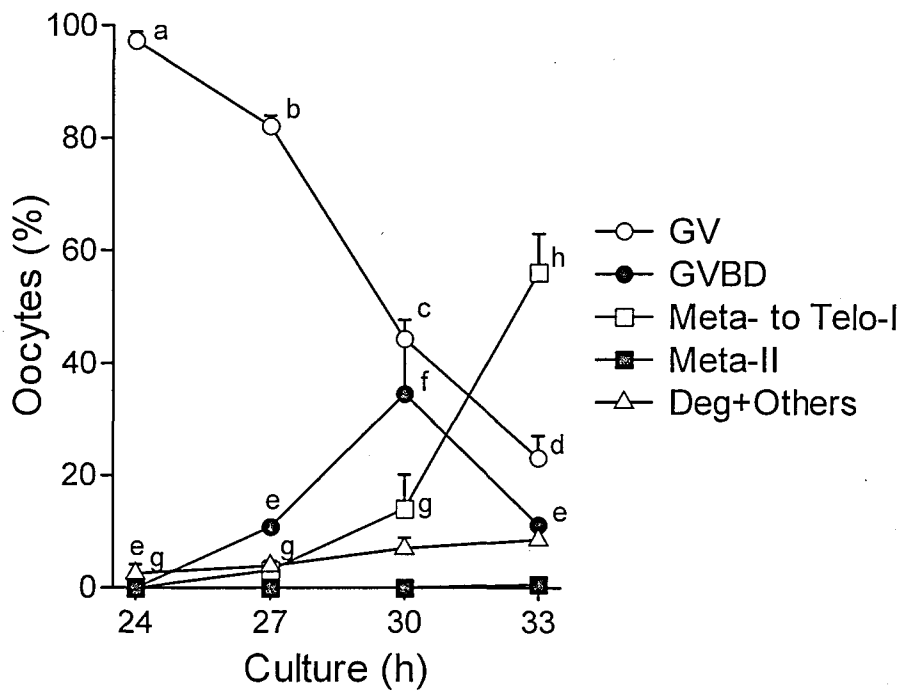


Fig. 2 ブタ COCs の GVBD の発生時期

GV	卵核胞期
GVBD	卵核胞崩壊
Meta- to Telo-I	第一減数分裂中期-終期
Meta-II	第二減数分裂中期
Deg + Others	退行卵およびその他

Table 1 GV 期におけるブタ卵の裸化が IVM 後の成熟率におよぼす影響

試験区	供試卵母細胞数	成熟卵 (%)
対照区	106	68 (64.5 ± 7.1) ^a
DO 0 h 区	131	52 (41.7 ± 11.5) ^b
DO 24 h 区	172	67 (38.5 ± 8.1) ^b
DO 24 h + CC 区	171	77 (45.0 ± 6.0) ^b
H-DO 24 h 区	166	57 (34.3 ± 3.8) ^b

平均値 ± 標準誤差

^{a vs b} 異なる文字間に有意差あり ($P < 0.05$)。

対照区 卵丘細胞-卵母細胞複合体(cumulus-oocyte complexes; COCs)

DO 0 h 区 採卵直後に卵丘細胞を裸化

DO 24 h 区 IVM 開始 24 時間後に卵丘細胞を裸化

DO 24 h + CC 区 IVM 開始 24 時間後に卵丘細胞を裸化し、卵丘細胞と共培養

H-DO 24 h 区 IVM 開始 24 時間後に卵母細胞から部分的に卵丘細胞を裸化

Table 2 ブタの GV 期卵および成熟卵の細胞質内 GSH 含有量

試験区 ^a	培養時間 (h)		
	0	24	44
対照区	7.48 ± 0.27 ^A	8.03 ± 0.32 ^{b,A}	9.60 ± 0.40 ^{b,B}
DO 0 h 区	(7.48 ± 0.27) ^A	3.02 ± 0.19 ^{c,B}	4.03 ± 0.63 ^{d,B}
DO 24 h 区	(7.48 ± 0.27) ^A	(8.03 ± 0.32) ^{d,A}	5.09 ± 0.69 ^{d,B}
DO 24 h + CC 区	(7.48 ± 0.27) ^A	(8.03 ± 0.32) ^{d,A}	5.26 ± 0.36 ^{c,d,B}
H-DO 24 h 区	(7.48 ± 0.27) ^A	(8.03 ± 0.32) ^{d,A}	7.00 ± 0.66 ^{c,B}

平均値 ± 標準誤差(pmol/oocyte)

^a Table 1 を参照

^{b-d} 同一カラム内において異なる文字間に有意差あり ($P < 0.05$)。

^{A vs B} 同一試験区内において異なる文字間に有意差あり ($P < 0.05$)。

Table 3 GV 期におけるブタ卵の裸化が IVF 後の卵細胞質内精子、MPN 形成および単精子受精に及ぼす影響

試験区 ^a	供試卵子数	精子侵入卵 (%)	MPN 形成卵 (%)	単精子受精卵 (%)
対照区	156	141 (90.4 ± 2.6)	126 (89.4 ± 3.5) ^b	43 (30.5 ± 6.0)
DO 0 h 区	68	58 (85.3 ± 5.0)	24 (41.4 ± 7.1) ^d	11 (19.0 ± 13.2)
DO 24 h 区	56	54 (96.4 ± 1.8)	32 (59.3 ± 14.2) ^{c,d}	4 (7.4 ± 5.2)
DO 24 h + CC 区	93	81 (87.1 ± 8.9)	41 (50.6 ± 11.2) ^{c,d}	11 (19.0 ± 2.3)
H-DO 24 h 区	138	135 (97.8 ± 1.2)	108 (80.0 ± 9.0) ^{b,c}	18 (13.3 ± 4.3)

平均値 ± 標準誤差

^a Table 1 を参照

^{b-d} 異なる文字間に有意差あり ($P < 0.05$)。

Table 4 GV 期におけるブタ卵の裸化が IVF 後の胚盤胞への発生能と
胚盤胞細胞数

試験区 ^a	供試卵子数	胚盤胞数 (%)	胚盤胞細胞数
対照区	117	24 (19.9 ± 5.5) ^b	46.6
DO 0 h 区	32	1 (3.0 ± 3.0) ^d	22.0
DO 24 h 区	60	3 (4.3 ± 1.7) ^d	15.2
DO 24 h + CC 区	52	2 (4.5 ± 2.4) ^d	22.5
H-DO 24 h 区	61	7 (11.6 ± 5.8) ^c	42.6

平均値 ± 標準誤差

^a Table 1 を参照

^{b-d} 異なる文字間に有意差あり ($P < 0.05$)。

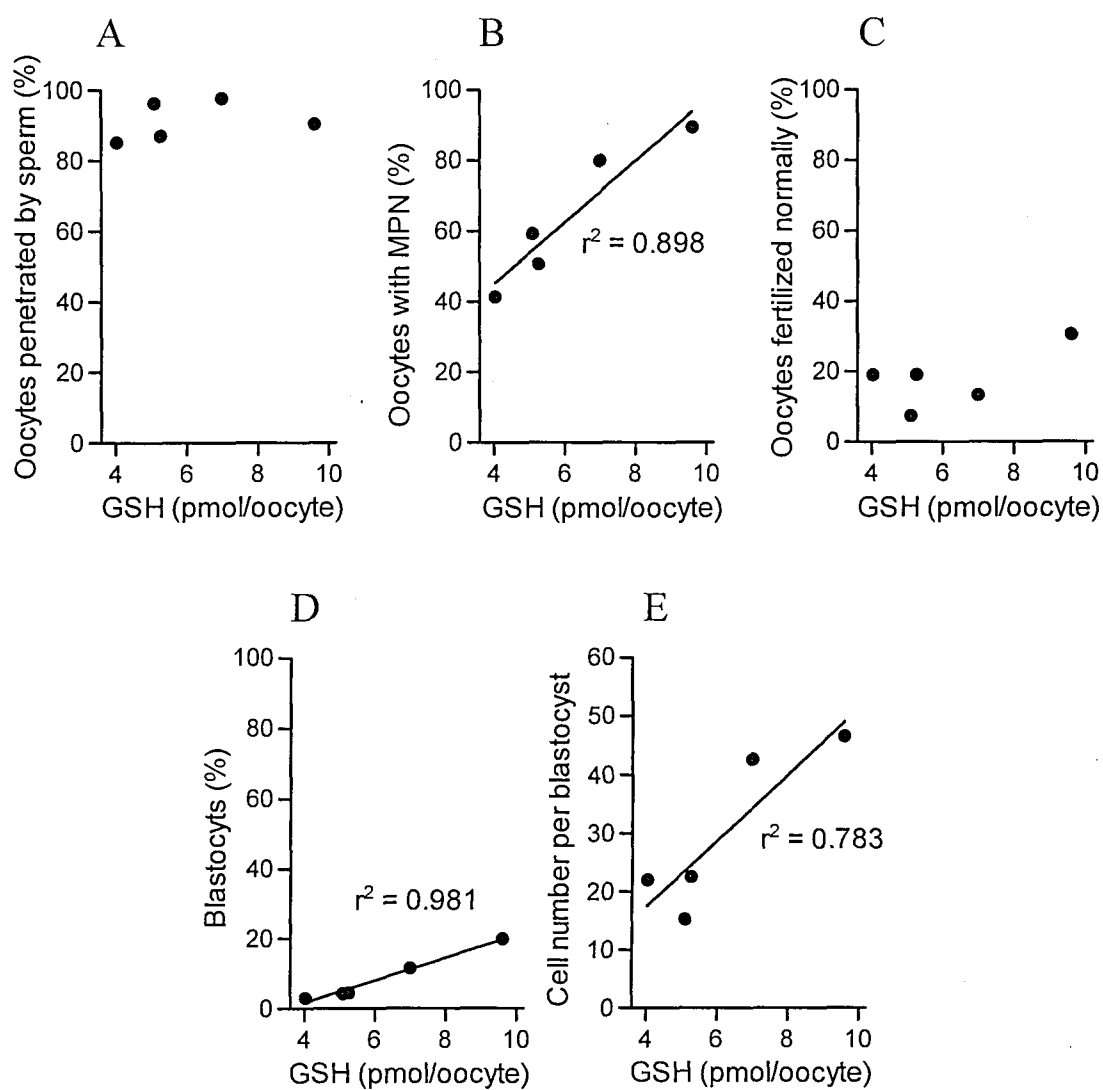


Fig. 3 成熟卵細胞質内GSH量と受精能(A. 精子侵入率、B. 雄性前核(MPN)形成率、C. 単精子受精率)および胚発生能(D. 胚盤胞への発生率、E. 胚盤胞の平均細胞数)との相関

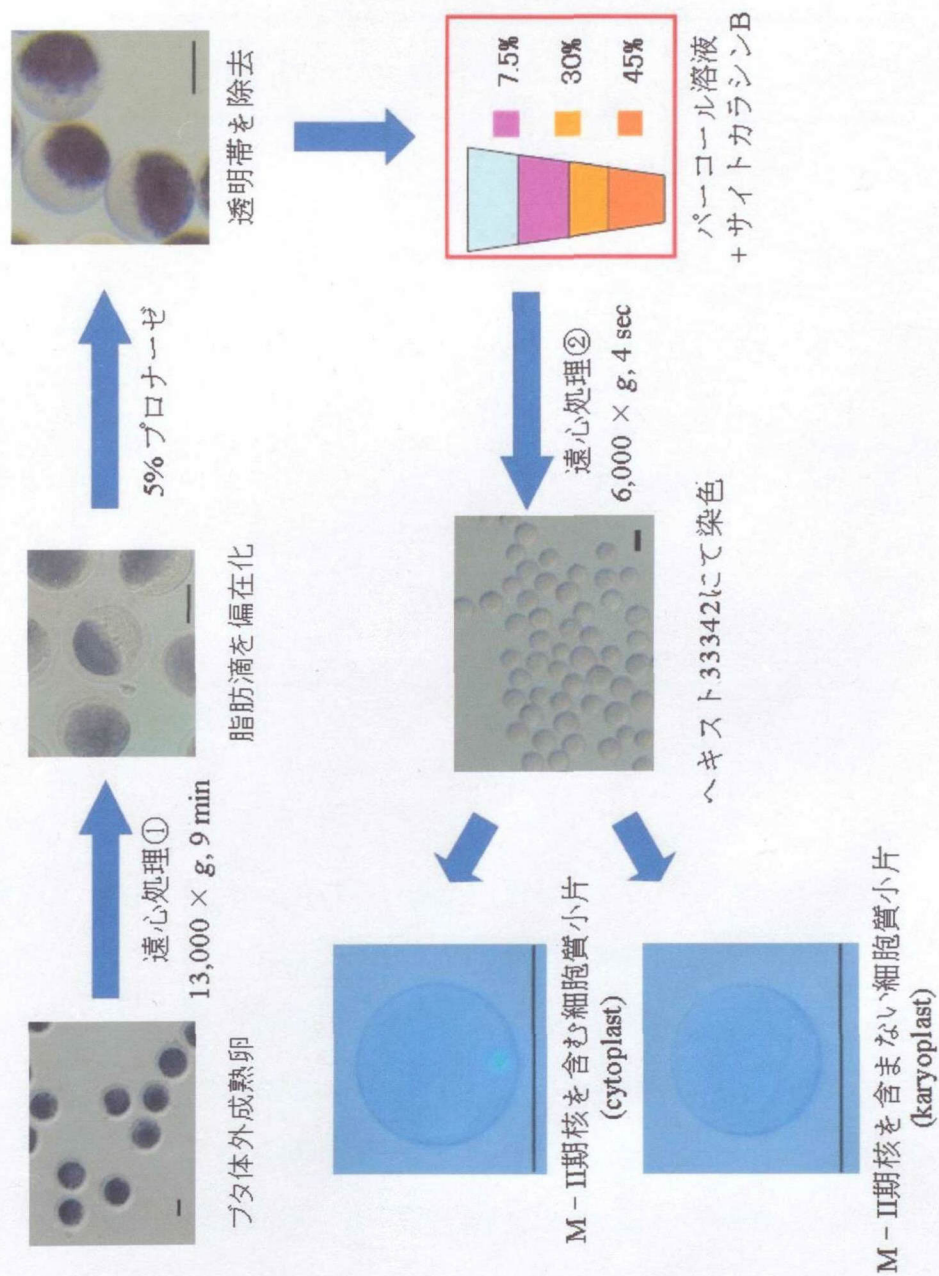


Fig. 4 パーコールの密度勾配を利用したブタ成熟卵からのM-II期核を含まない細胞質小片(cytoplast)およびM-II期核を含む細胞質小片(karyoplast)の作出手順(Bar = 100 μ m)

Table 5 対照区とCentri-Fusion法を応用し作出した核置換卵の融合率
および卵直径

試験区	供試卵数	融合卵数 (%)	卵直径(μm)
対照区	92	No Data	110.5 ± 0.4 ^e
K 区	79	No Data	75.0 ± 0.7 ^c
K + 1 C 区	69	69 (100.0 ± 0.0) ^b	95.2 ± 0.7 ^d
K + 2 C 区	60	42 (71.3 ± 11.1) ^c	108.5 ± 0.9 ^e
K + 3 C 区	58	42 (73.1 ± 4.9) ^c	117.4 ± 1.1 ^f
K + 4 C 区	80	39 (46.9 ± 10.9) ^c	127.1 ± 1.0 ^g

平均値 ± 標準誤差

^{a vs b} 融合率において異なる文字間に有意差あり ($P < 0.05$)。

^{c - g} 卵直径において異なる文字間に有意差有り ($P < 0.05$)。

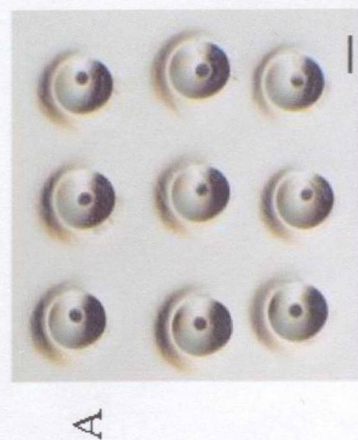
- 対照区
 COCs から遠心処理-1 後に、透明帯を除去した区。
- K 区
 遠心処理-2 後に得られた karyoplast に融合刺激を付与した区。
- K + 1 C 区
 遠心処理-2 後に得られた karyoplast と cytoplasm を 1 つ融合した区。
- K + 2 C 区
 遠心処理-2 後に得られた karyoplast と cytoplasm を 1 つ融合した区。
- K + 3 C 区
 遠心処理-2 後に得られた karyoplast と cytoplasm を 3 つ融合した区。
- K + 4 C 区
 遠心処理-2 後に得られた karyoplast と cytoplasm を 4 つ融合した区。

Table 6 対照区と Centri-Fusion 法を応用し作出した核置換卵の
単為発生誘起処理後の FPN 形成率

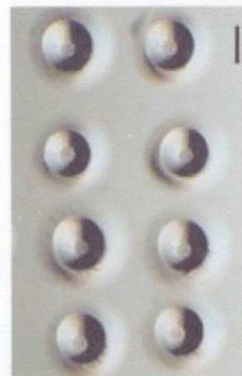
試験区 ^a	供試卵数	FPN 形成卵数 (%)
対照区	59	41 (66.0 ± 13.0)
K 区	67	37 (58.2 ± 12.5)
K + 1 C 区	73	44 (77.4 ± 6.9)
K + 2 C 区	69	44 (63.3 ± 8.5)
K + 3 C 区	51	45 (87.3 ± 2.2)
K + 4 C 区	77	59 (75.2 ± 13.8)

平均値 ± 標準誤差

^a Table 5 を参照



A



B

Fig. 5 WOW system を用いた屠場卵巣由来の成熟卵および Centri-Fusion 法を応用し作出した核置換卵の IVC(Bar = 500 μ m)

A. 屠場卵巣由来のブタ成熟卵の WOW system による IVC

B. Centri-Fusion 法により作出したブタ核置換卵の WOW system による IVC

Table 7 対照区と Centri-Fusion 法を応用し作出した核置換卵の IVF 後の受精能

試験区 ^a	供試卵数	精子侵入卵数 (%)	単精子受精卵数* (%)	MPN 形成卵数 (%)
対照区	93	73 (78.0 ± 6.6)	24 (32.9 ± 4.8) ^c	71 (96.6 ± 2.2)
K 区	69	50 (73.1 ± 6.7)	19 (61.6 ± 14.0) ^b	47 (94.1 ± 4.3)
K + 1 C 区	82	67 (82.2 ± 4.9)	17 (25.6 ± 5.0) ^c	65 (97.4 ± 1.6)
K + 2 C 区	59	44 (74.6 ± 8.6)	14 (34.9 ± 8.5) ^c	41 (92.3 ± 3.5)
K + 3 C 区	49	46 (93.8 ± 2.3)	6 (18.2 ± 4.4) ^c	29 (95.6 ± 4.4)
K + 4 C 区	43	37 (86.6 ± 3.8)	8 (19.2 ± 9.3) ^c	36 (97.1 ± 2.9)

平均値 ± 標準誤差

^a Table 5 を参照

^{b vs c} 異なる文字間に有意差あり ($P < 0.05$)。

*単精子受卵は精子 1 つが卵細胞質内に侵入した卵と定義する。

Table 8 対照区およびCentri-Fusion法を応用し作出した核置換卵の
IVF/IVC後の胚盤胞への発生率とその細胞数

試験区 ^a	供試卵数	胚盤胞数 (%)	胚盤胞細胞数 (個)
対照区	113	20 (17.8 ± 2.9) ^b	26.2 ± 2.8 ^f
K 区	80	0 (0.0 ± 0.0) ^c	No Data
K + 1 C 区	70	2 (2.5 ± 2.5) ^e	7.5 ± 2.5 ^g
K + 2 C 区	105	5 (4.7 ± 1.3) ^{d,e}	8.3 ± 3.1 ^g
K + 3 C 区	78	7 (9.8 ± 3.4) ^{c,d}	16.0 ± 2.4 ^{f,g}
K + 4 C 区	84	13 (15.3 ± 2.2) ^{b,c}	15.3 ± 4.2 ^{f,g}

平均値 ± 標準誤差

^a Table 5 を参照

^{b-e} 胚盤胞への発生率において異なる文字間に有意差あり ($P < 0.05$)。

^{f vs g} 胚盤胞細胞数において異なる文字間に有意差有り ($P < 0.05$)。

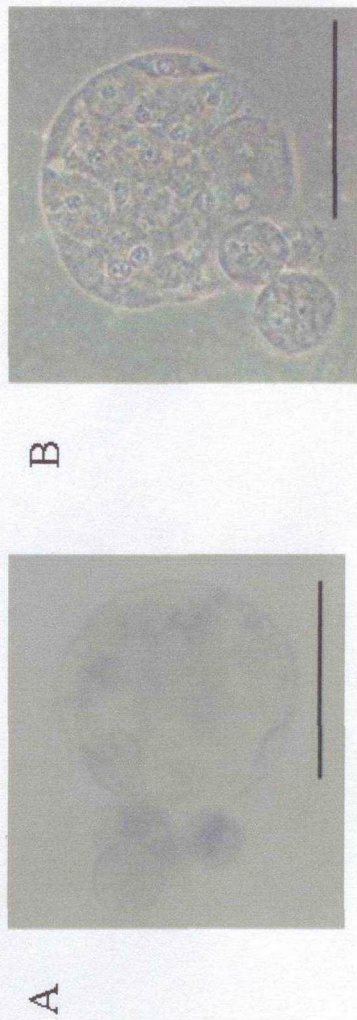


Fig.6 Centri-Fusion法を応用し作出した核置換卵を6日間IVCすることで得られた胚盤胞(Bar = 100 μ m)

A. 固定/染色前の胚盤胞

B. 固定/染色後の胚盤胞(細胞数約45個)

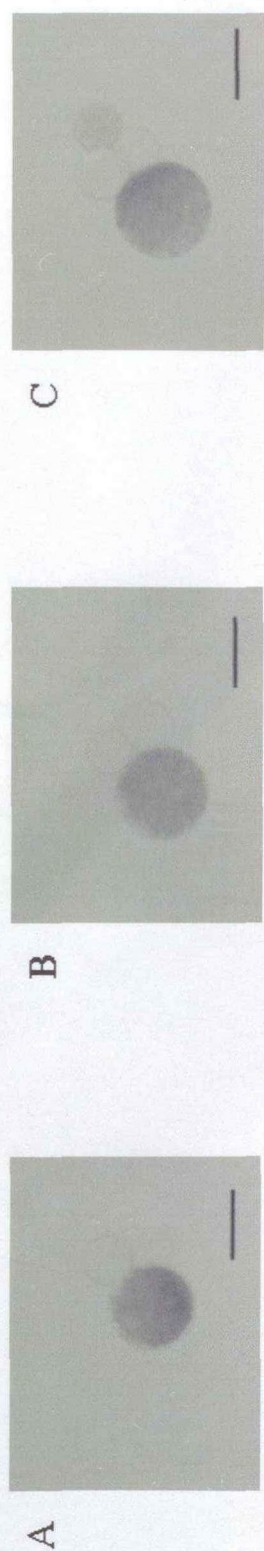


Fig. 7 屠場卵巢由来のブタ成熟卵を用いた細胞質添加卵の細胞融合直前の成熟卵と細胞質小片の状態(Bar = 100 μ m)

- A. 成熟卵に細胞質小片を1つ接着させたO + 1C区。
- B. 成熟卵に細胞質小片を2つ接着させたO + 2C区。
- C. 成熟卵に細胞質小片を3つ接着させたO + 3C区。

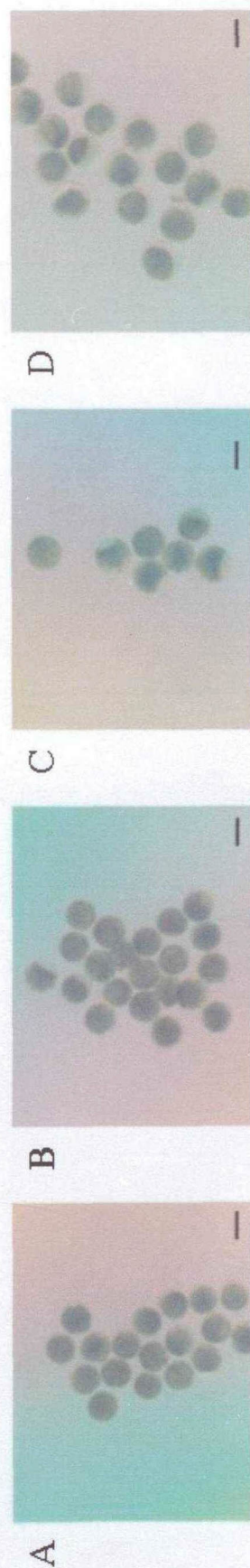


Fig. 8 細胞質添加卵の細胞融合刺激後に得られた細胞質添加卵(Bar = 100 μ m)

- A. 屠場卵巣由来の成熟卵(対照区)
- B. 屠場卵巣由来の成熟卵に細胞質小片を1つ融合させて作出した細胞質添加卵(O + 1 C区)
- C. 屠場卵巣由来の成熟卵に細胞質小片を2つ融合させて作出した細胞質添加卵(O + 2 C区)
- D. 屠場卵巣由来の成熟卵に細胞質小片を3つ融合させて作出した細胞質添加卵(O + 3 C区)

Table 9 対照区および細胞質添加区の融合率および卵直径

試験区	供試卵数	融合卵数 (%)	卵直径(μm)
対照区	63	No data	106.7 ± 0.5 ^a
O 区	60	No data	105.8 ± 0.8 ^a
O+1 C 区	66	66 (100.0 ± 0.0)	113.9 ± 0.8 ^b
O+2 C 区	62	58 (93.4 ± 3.5)	121.6 ± 0.9 ^c
O+3 C 区	60	59 (98.3 ± 1.7)	129.7 ± 1.1 ^d

平均値 ± 標準誤差

^{a-d}. 卵直径において異なる文字間に有意差有り ($P < 0.05$)。

- 対照区透明帯を除去した成熟卵に融合刺激を行わなかった区。
- O 区透明帯を除去した成熟卵に融合刺激を付与した区。
- O+1 C 区透明帯を除去した成熟卵に cytoplasm を 1 つ融合させた区。
- O+2 C 区透明帯を除去した成熟卵に cytoplasm を 2 つ融合させた区。
- O+3 C 区透明帯を除去した成熟卵に cytoplasm を 3 つ融合させた区。

Table 10 対照区および細胞質添加卵の単為発生誘起処理後の
 胚盤胞の発生率と細胞数

試験区 ^a	供試卵数	胚盤胞数 (%)	胚盤胞細胞数 (個)
対照区	150	20 (15.0 ± 3.0)	28.1 ± 3.6
O 区	148	26 (17.8 ± 2.3)	39.4 ± 6.7
O + 1 C 区	49	13 (26.1 ± 3.9)	21.6 ± 3.6
O + 2 C 区	62	13 (27.1 ± 5.6)	29.3 ± 3.6
O + 3 C 区	53	13 (23.1 ± 4.8)	33.4 ± 8.5

平均値 ± 標準誤差

^a Table 9 を参照。

Table 11 対照区および細胞質添加卵の IVF 後の胚盤胞の発生率と細胞数

試験区 ^a	供試卵数	胚盤胞数 (%)	胚盤胞細胞数 (個)
対照区	103	15 (14.6 ± 1.5) ^b	39.2 ± 5.2
O 区	95	16 (16.0 ± 2.3) ^b	35.9 ± 4.1
O + 1 C 区	98	36 (34.1 ± 4.6) ^c	42.5 ± 5.6
O + 2 C 区	70	23 (31.6 ± 2.2) ^c	47.3 ± 7.4
O + 3 C 区	91	25 (26.8 ± 1.5) ^c	58.6 ± 10.1

平均値 ± 標準誤差

^a Table 9 を参照。

^b vs ^c 胚盤胞への発生率において異なる文字間に有意差有り ($P < 0.05$)。



A



B

Fig. 9 屠場卵巣由来の成熟卵を用いて作出した細胞質添加卵を7日間IVCすることで得られた胚盤胞

A. O+1C 区において IVF/IVC することで得られた固定/染色前の胚盤胞(細胞数約 52 個)

B. O+3C 区において IVF/IVC することで得られた固定/染色後の胚盤胞(細胞数約 89 個)

Table 12 Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵と、屠場卵巣由来のブタ成熟卵を用い、Centri-Fusion 法を応用し作出した核置換卵の電気刺激後の単為発生能

試験区 ^a	供試卵数	胚盤胞数 (%)	胚盤胞細胞数 (個)
対照区(K + 2 C)	53	2 (4.5 ± 2.6)	14.0 ± 4.0
対照区(K + 3 C)	71	3 (4.5 ± 0.9)	17.2 ± 4.1
Xeno-K + 2 C 区	48	0 (0.0 ± 0.0)	No Data
Xeno-K + 3 C 区	56	4 (6.3 ± 3.6)	13.6 ± 1.8

平均値 ± 標準誤差

対照区(K + 2 C)	屠場卵巣由来の成熟卵の核(K)と、細胞質小片(C)を 2 つ融合させた区。
対照区(K + 3 C)	屠場卵巣由来の成熟卵の核(K)と、細胞質小片(C)を 3 つ融合させた区。
Xeno-K + 2 C 区	Xenograft 卵巣由来の成熟卵の核(Xeno-K)と、細胞質小片(C)を 2 つ融合させた区。
Xeno-K + 3 C 区	Xenograft 卵巣由来の成熟卵の核(Xeno-K)と、細胞質小片(C)を 3 つ融合させた区。

Table 13 Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵に屠場由来卵巣の細胞質小片を融合させることで作出した細胞質添加卵および対照区の単為発生誘起処理後の胚盤胞の発生率と細胞数

試験区	供試卵数	胚盤胞数 (%)	胚盤胞細胞数 (個)
対照区 (O)	63	2 (3.6 ± 1.9)	17.2 ± 7.2
対照区 (O + 3 C)	50	8 (18.0 ± 4.7)	42.8 ± 8.2
試験区 (Xeno-O + 3 C)	89	23 (24.8 ± 8.1)	49.3 ± 7.8

平均値 ± 標準誤差

対照区(O)	屠場卵巣由来のブタ成熟卵の透明帯を除去し、細胞融合刺激を付与した区。
対照区(O + 3 C)	屠場卵巣由来のブタ成熟卵に、屠場卵巣由来の成熟卵から作出した cytoplasm(C)を 3 つ融合させた区。
試験区(Xeno-O + 3 C)	異種移植ブタ卵巣由来の成熟卵に、屠場卵巣由来の成熟卵から作出した cytoplasm(C)を 3 つ融合させた区。

Table 14 Xenograft 卵巣由来のブタ成熟卵に屠場由来卵巣の細胞質小片を
融合させることで作出した細胞質添加卵および対照区の
IVF 後の胚盤胞の発生率と細胞数

試験区 ^a	供試卵数	胚盤胞数 (%)	胚盤胞細胞数 (個)
対照区 (O)	64	9 (13.3 ± 6.7)	25.4 ± 5.2
対照区 (O + 3 C)	56	11 (19.9 ± 1.9)	39.9 ± 8.2
試験区 (Xeno-O + 3 C)	142	18 (16.1 ± 6.1)	32.5 ± 6.7

平均値 ± 標準誤差

^aTable 13 を参照。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導とご助言をいただきました麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室 柏崎直巳 教授ならびに伊藤潤哉 講師に感謝いたします。

また、本論文の校閲をいただきました、実験動物学研究室 二宮 博義 教授、動物工学研究室 滝沢 達也 教授および動物資源育種学研究室 神作 宜男 准教授に御礼申し上げます。

さらに独立行政法人 農業生物資源研究所 動物科学研究領域 生殖機構研究ユニット 菊地和弘 博士、金子浩之 博士をはじめ、生殖機構研究ユニットの皆様には研究のご指導、本論文の作成に多くのご助言とご校閲をいただきました。心より感謝申し上げます。

最後に、ご両親のご理解、ご協力に深く感謝申し上げます。